

Einfluss genetischer Prädisposition für hohe und niedrige
Ausdauerkapazität auf Herzleistung, Mitochondrienfunktion und
Insulinempfindlichkeit bei Drucküberlastung in der Ratte

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Christina Schenkl
geboren am 17.08.1987 in Zwickau**

Gutachter

1. Prof. Dr. Torsten Doerst

2. Prof. Dr. Reinhard Wetzker

3. Dr. rer. nat. habil. Volker Adams

Tag der öffentlichen Verteidigung: 21.08.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	5
Einheiten	7
Zusammenfassung	8
1 Einleitung	10
1.1 Herzinsuffizienz	10
1.2 Körperliche Leitungsfähigkeit	11
1.3 Insulinempfindlichkeit	12
1.4 Mitochondrienfunktion	13
1.4.1 Oxidativer Stress.....	14
1.5 Drucküberlastung und Herzinsuffizienz bei der Ratte.....	14
1.5.1 Das Modell der High capacity runners und Low capacity runners.....	16
Ziel der Arbeit.....	17
2 Methodik	18
2.1 Tiermodell.....	18
2.2 Studiendesign.....	18
2.3 Aerobe Ausdauerkapazität	19
2.4 Transverse Aortenkonstriktion	19
2.5 Überlebenszeitanalyse	20
2.6 Echokardiografie.....	20
2.7 Glukosetoleranz.....	22
2.8 Organentnahme.....	22
2.9 Proteinanalytik	23
2.10 Mitochondriale Morphologie und respiratorische Kapazität	25
2.10.1 Mitochondrienisolation	25
2.10.2 Durchflusszytometrie	26
2.10.3 Citratsynthaseaktivität.....	26

2.10.4	Messung der respiratorischen Kapazität der Mitochondrien	27
2.11	ADP-limitierte Respiration	29
2.12	ADP/O-Verhältnis	29
2.13	Quantifizierung des Gesamtproteins	30
2.14	Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase.....	30
2.15	Antioxidative Enzymaktivität – Probenvorbereitung	30
2.15.1	Katalase.....	31
2.15.2	Superoxid Dismutase.....	31
2.15.3	Glutathion-Peroxidase	32
2.16	Isolierte Herzperfusion	32
2.17	Histologie	33
2.18	Statistik.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Aerobe Ausdauerkapazität	34
3.2	Überlebensanalyse.....	34
3.3	Kardiale Morphometrie und Funktion.....	34
3.4	Morphometrie	38
3.5	Glukosetoleranz.....	40
3.6	Proteinanalytik.....	42
3.7	Isolierte Mitochondrien	43
3.7.1	Morphologie isolierter Mitochondrien	44
3.7.2	Proteinkonzentration	45
3.7.3	Citratsynthaseaktivität.....	46
3.8	Funktion/ respiratorische Kapazität isolierter Mitochondrien	46
3.8.1	<i>M. gastrocnemius</i> -Mitochondrien	46
3.8.2	Herzmitochondrien	49
3.8.3	Lebermitochondrien	52
3.8.4	ADP-limitierte Respiration	53

3.8.5	ADP/O	54
3.8.6	Die Substrate PC und PCoA und die Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase	56
3.9	Aktivität antioxidativer Enzyme	58
3.10	Isolierte Herzperfusion	59
3.11	Histologie	61
4	Diskussion.....	62
	Betrachtung methodischer Limitationen	70
	Schlussfolgerung.....	71
	Literatur- und Quellenverzeichnis	72
5	Anhang.....	I
5.1	Abbruchkriterien des Laufbandtests zur Ermittlung der maximalen Ausdauerkapazität.....	I
5.2	Überlebensanalyse nach Log-Rank.....	II
5.3	Messwerte der systolischen und diastolischen Funktion	III
5.4	Citratsynthaseaktivität isolierter Mitochondrienpopulationen	IV
5.5	Maximale respiratorische Kapazität isolierter Mitochondrien des <i>M. gastrocnemius</i> während kardialer Drucküberlastung.....	V
5.6	Geräte und Instrumente.....	VIII
5.7	Verbrauchsmaterialien.....	VIII
5.8	Chemikalien.....	IX
5.9	Medikamente	XI
	Abbildungsverzeichnis.....	XII
	Tabellenverzeichnis.....	XIII
	Danksagung	XIV
	Ehrenwörtliche Erklärung	XV

Abkürzungen

A Geschwindigkeit des aktiven Einstroms

A'	Myokardbewegung während des aktiven Einstroms
ACCF	American College of Cardiology Foundation
AHA	American Heart Association
CPT1/2	Carnitin-Palmitoyltansferase 1/2
DHQ	Tetramethylhydroquinone
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNP	Dinitrophenol
DT	Dezelerationszeit
DTT	Dithiothreitol
DTNB	5,5'-dithiobis-(2nitrobenzoesäure)
E	Geschwindigkeit des passiven Einstroms
e' [*]	Myokardbewegung während des passiven Einstroms
ESC	European Society of Cardiology
EF	Ejektionsfraktion
FS	Verkürzungsfraktion
Glu/Mal	Glutamat/Malat
GPx	Glatathionperoxidase
HCR	High Capacity Runners
HF	Herzinsuffizienz
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltender Ejektionsfraktion
HFmrEF	Herzinsuffizienz mit mäßig reduzierter Ejektionsfraktion
HFrfEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion
IFM	interfibrilläre Mitochondrien
i.p.	intraperitoneal
LCR	Low Capacity Runners
Lsg.	Lösung
LV	linker Ventrikel
LVM	Masse des linken Ventrikels
LVAW,s/d	Vorderwanddicke in Systole und Diastole
LVID,s/d	Innendurchmesser, endsystolisch und enddiastolisch
LVMi	Linksventrikulärer Massenindex
LVPW,s/d	Hinterwanddicke in Systole und Diastole
LVV,s/d	Ventrikelvolumen in Systole und Diastole
ns	nicht signifikant
NYHA	New York Heart Association
p	Signifikanzniveau
PC	Palmitoylcarnitin
PC/Mal	Palmitoylcarnitin/Malat
PCoA	Palmitoyl-CoA + Carnitin
SEM	Standardfehler
SG-P	Sammelgelpuffer
SOD	Superoxiddismutase
SSM	subsarkolemmale Mitochondrien
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

TAC	transverse Aortenkonstriktion
Tbl	Tablette
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TG-P	Trenngelpuffer
TMPD	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Einheiten

Zeit	Millisekunde	[ms]
	Sekunde	[s]
	Minute	[min]
Längenmaße	Millimeter	[mm]
	Meter	[m]
Massen	Mikrogramm	[µg]
	Milligramm	[mg]
	Gramm	[g]
	Kilogramm	[kg]
Hohlmaße	Milliliter	[ml]
	Liter	[L]
Stoffmenge	Mol	[mol]
	Millimol	[mmol]
Stromstärke	Milliampere	[mA]
Spannung	Volt	[V]
Respiratorische Kapazität		[nAtomeO/min/mg]

Zusammenfassung

Herzinsuffizienz ist eine der führenden Todesursachen weltweit. Eine der Hauptursachen ist die Druckbelastung des Herzens. Es ist jedoch ein Zusammenhang zwischen Mitochondrienfunktion und Herzfunktion und eine Assoziation von Insulinresistenz und Herzinsuffizienz bekannt. Eine kontraktile Dysfunktion ist mit einer mitochondrialen Dysfunktion assoziiert. Als Risikofaktoren für das Entstehen einer Herzinsuffizienz gelten Diabetes mellitus, Übergewicht und ein Mangel an körperlicher Aktivität. Als bester Prädiktor für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität gilt aktuell die aerobe Leistungsfähigkeit. Der Einfluss der aeroben Leistungsfähigkeit auf die druckinduzierte Herzinsuffizienz ist bisher allerdings ungeklärt. Die aerobe Leistungsfähigkeit besteht aus einer extrinsischen (trainierten) und einer intrinsischen (genetisch bedingten) Komponente. Die getrennte Betrachtung beider Faktoren ist beim Menschen nicht möglich. Im Rattenmodell hingegen kann der alleinige Einfluss intrinsischer Ausdauerkapazität auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz untersucht werden. Hierfür dienen Tiere, die auf hohe (HCR) und niedrige (LCR) genetisch bedingte maximale Laufkapazität gezüchtet wurden. Tatsächlich zeigen LCR eine geringere aerobe Leistungsfähigkeit, eine verkürzte Lebensdauer und einen erhöhten Blutglukosespiegel im Vergleich zu HCR.

Es war das Ziel dieser Arbeit den Einfluss einer genetischen Prädisposition für hohe und niedrige körperliche Leistungsfähigkeit bei der Entwicklung einer durch Drucküberlastung induzierten Herzinsuffizienz zu untersuchen. Speziell sollte der Zusammenhang zwischen Mitochondrienfunktion und kardialen Phänotyp untersucht werden.

Bei HCR und LCR Ratten wurde im Alter von drei Wochen operativ eine linksventrikuläre Drucküberlastung mittels transverser Aortenkonstriktion (TAC) erzeugt. Die Überlebenszeit aller TAC-Tiere wurde dokumentiert und verglichen. Nach zwei, sechs, zehn und zwanzig Wochen wurden die systolische und diastolische Funktion bei TAC- und altersangepassten Kontrolltieren echokardiografisch gemessen. Die systemische Insulinsensitivität wurde durch peritoneale Glukosetoleranztests charakterisiert und die Insulinrezeptorphosphorylierung organspezifisch im Herzen durch Western Blot-

Analysen bestimmt. Die kardiale Glukose- und Fettsäureoxidation sowie die Insulinantwort wurden zusätzlich in isolierten, arbeitenden Herzen untersucht. Zur Charakterisierung der mitochondrialen respiratorischen Funktion wurden interfibrilläre (IFM) und subsarkolemmale (SSM) Mitochondrien aus Herz- und Skelettmuskel (*M. gastrocnemius*) durch differenzielle Zentrifugation getrennt isoliert. Die maximale respiratorische Kapazität der mitochondrialen Atmungskette wurde mittels Clark-Elektrode gemessen. Die Citratsynthaseaktivität wurde als Marker für mitochondrialen Gehalt der Gewebe photometrisch gemessen.

Ohne Drucküberlastung wiesen LCR eine geringere Glukosetoleranz als HCR auf und zeigten eine geringere respiratorische Aktivität der Leber- und Skelettmuskelmitochondrien. Im Herzen hingegen unterschied sich die mitochondriale Aktivität nicht. Isoliert arbeitende Herzen der LCR erreichten eine höhere Leistung als die der HCR. Die Echokardiografie in vivo ergab aber keinen Unterschied in der kardialen Funktion von HCR und LCR.

Überraschenderweise überlebten LCR die kardiale Drucküberlastung länger als HCR (mittlere Überlebensdauer: LCR $22,4 \pm 1,7$ vs. HCR $16,0 \pm 1,6$ Wochen; $p=0,03$). Diese Beobachtung ging mit einer frühzeitigeren Einschränkung der Herzfunktion bei HCR einher. HCR wiesen bereits zehn Wochen nach TAC eine reduzierte diastolische und systolische Funktion auf. Bei LCR war eine verminderte Kontraktilität erst nach 20 Wochen zu beobachten. TAC hatte keinen Einfluss auf die Glukosetoleranz. LCR zeigten nach zwei Wochen TAC eine erhöhte State 3 Atmung in isolierten Mitochondrien. Dieser Effekt wurde nach zehn Wochen TAC deutlicher. Derartige Veränderungen wurden bei HCR nicht beobachtet. Der mitochondriale Gehalt der Gewebe, gemessen an der Citratsynthase, wurde durch TAC nicht beeinflusst. Schließlich waren die isolierten, arbeitenden Herzen der LCR nach Drucküberlastung durch einen geringeren ATP-Verbrauch/Leistung gekennzeichnet als die der HCR.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine genetische Prädisposition für hohe aerobe Leistungsfähigkeit nicht durch eine gesteigerte Toleranz gegenüber Drucküberlastung gekennzeichnet ist. Das bessere Überleben der LCR unter Druckbelastung ist mit einer länger erhaltenen systolischen Funktion sowie einer Steigerung der maximalen mitochondrialen Respiration und einer effizienteren ATP-Verwendung assoziiert.

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Herzinsuffizienz ist eine der Haupttodesursachen. Weltweit sind 37,7 Millionen Menschen von einer Herzinsuffizienz betroffenen (Li & Zhang 2016) und jährlich werden etwa 3,6 Millionen neue Fälle diagnostiziert. Eine erst 2017 veröffentlichte prospektive Studie untersuchte das Auftreten von Herzinsuffizienz in Deutschland und fand, dass in Deutschland jährlich mit 524000 Neuerkrankungen zu rechnen ist (Störk *et al.* 2017). Herzinsuffizienz wird als Syndrom bezeichnet und ist durch Symptome wie Atemnot, Erschöpfung und Ödembildung gekennzeichnet, die auf eine eingeschränkte ventrikuläre Funktion des Herzens zurückzuführen sind (Hunt *et al.* 2009, McMurray *et al.* 2012). Die NYHA-Klassifizierung beschreibt den symptomatischen Status des Individuums bewertet seine Leistungsfähigkeit (Yancy *et al.* 2013). Die Diagnostik der kardialen Pumpfunktion erfolgt anhand definierter Leitlinien. Die ACCF/AHA-Stadien beurteilen die Entwicklung und das Voranschreiten der Herzinsuffizienz. Hierfür dient die linksventrikuläre, systolische Funktion als Hauptcharakteristik der kardialen Funktion und damit zur Beurteilung der Insuffizienz. Gemäß ESC-Richtlinien wird die Herzinsuffizienz in drei Stadien unterteilt: Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (EF) (HFpEF), mit mittelgradig reduzierter EF (HFmrEF) und mit reduzierter EF (HFrEF) (Ponikowski *et al.* 2016). Eine linksventrikuläre EF von <40% gilt dabei als Marker für eine HFrEF (Hunt *et al.* 2009, Yancy *et al.* 2013). Die hypertrophe (HCM) und die dilatative Kardiomyopathie zählen zu den häufigsten Formen der Herzinsuffizienz (Elliott & McKenna 2004). Die Inzidenzrate für Nachkommen von Eltern, die bereits an Herzinsuffizienz erkrankten, liegt bei 2,72% während Nachkommen gesunder Eltern eine Inzidenzrate von lediglich 1,62% zeigen (Lee *et al.* 2006). Das Risiko, eine Herzinsuffizienz zu entwickeln, scheint somit durch eine erbliche (intrinsische) Komponente bedingt.

Weiterhin stellen bekannte Lebensstil assoziierte (erworbene) Faktoren wie Übergewicht und eine reduzierte Insulinempfindlichkeit, wie sie bei Diabetes mellitus Typ II besteht, Risiken für die Entstehung einer Herzinsuffizienz dar. Sie sind mit einem gestörten Glukose- und Fettsäuremetabolismus und darüber hinaus mit mitochondrialen Funktionseinschränkungen verbunden (Krum & Gilbert 2003, Ingelsson *et al.* 2005, Djoussé *et al.* 2007). Eine niedrige körperliche

Leitungsfähigkeit wird als stärkster Risikofaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz beschrieben (Lee *et al.* 2012).

1.2 Körperliche Leitungsfähigkeit

In einer großen prospektiven Humanstudie wurde die auf dem Laufband ermittelte körperliche Fitness mit der Sterblichkeitsrate der Kohorte verglichen. Die Gruppe mit der niedrigsten Ausdauerkapazität wies, unabhängig von weiteren Risikofaktoren, mit 64 Männern und 39,5 Frauen pro 10000 Teilnehmern im Beobachtungszeitraum deutlich mehr Todesfälle auf als die Gruppe mit der besten körperlichen Fitness (18,6 und 8,5/10000 Teilnehmer). Bei der Betrachtung von ausschließlich kardiovaskulären Erkrankungen zeigte sich derselbe Zusammenhang (Blair *et al.* 1989). Viele Studien beschreiben einen klaren Zusammenhang zwischen körperlicher Leistungsfähigkeit und kardiovaskulären Ereignissen (Sandvik *et al.* 1993, Kokkinos *et al.* 2008). So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Langzeitprognose von Patienten mit Koronarerkrankungen von ihrer körperlichen Leistungsfähigkeit abhängt (Myers *et al.* 2002). Die maximale Sauerstoffaufnahme während der körperlichen Belastung ($\text{VO}_{2\text{max}}$) gilt dabei als bester Marker für die Ausdauerkapazität (Fletcher *et al.* 2013) und ist statistisch direkt mit der Sterblichkeit aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse verbunden (MacArdle *et al.* 2007). Ausdauerkapazität und $\text{VO}_{2\text{max}}$ sind somit die stärksten Prädiktoren für die Sterblichkeit von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und unabhängig von anderen Risikofaktoren zu bewerten (Myers *et al.* 2002, Kavanagh *et al.* 2003).

Körperliche Inaktivität erhöht das Risiko für chronische Erkrankungen und senkt die Lebenserwartung (Lee *et al.* 2012). Es ist sogar ein dosisabhängiger Zusammenhang zwischen körperlicher Inaktivität und Gesamtsterblichkeit, sowie dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, Infarkten, Bluthochdruck und Diabetes mellitus II beschrieben (Warburton *et al.* 2010). Sportliche Aktivität ist im Gegensatz dazu vielfach als kardioprotektiv beschrieben (Kavazis 2009, Powers 2017). Sie reduzierte die Insulinresistenz und normalisierte die kardiale Funktion hypertensiver Herzinsuffizienz im Tiermodell (Stevens *et al.* 2015) und in klinischen Untersuchungen (Hwang *et al.* 2016). Ausdauertraining beeinflusst zudem die mitochondriale Funktion. Es steigert die mitochondriale Respiration, und führt durch einen reduzierten Sauerstoffbedarf zu einer höheren kardialen Effizienz (Hafstad *et al.* 2011). Experimentelle Studien beschreiben eine gesteigerte Expression und

Aktivität respiratorischer Proteine sowie eine effizientere ATP-Produktion (Holloszy 1967, Stallknecht *et al.* 1991). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Ausdauertraining die mitochondriale Biogenese steigert (Pilegaard *et al.* 2003) und zudem die antioxidative Aktivität erhöht (Husain 2003, Judge *et al.* 2005). Im Vordergrund steht dabei die Aktivität der SOD (Powers *et al.* 1993). Verminderte ROS und eine erhaltene mitochondriale Funktion könnten damit auch die kardiale Funktion entscheidend beeinflussen und aufrechterhalten (Frasier *et al.* 2011).

1.3 Insulinempfindlichkeit

Hohe Blutglukosespiegel sind mit einer erhöhten Insulinsekretion und Hyperinsulinämie verbunden, welche wiederum als ein Mechanismus voranschreitender Insulinresistenz gesehen werden. Systemische Insulinresistenz wird mit dem Entstehen einer linksventrikulären Hypertrophie in Verbindung gebracht (Karason *et al.* 2003). Hypertrophie stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz dar (Kannel 2000). Daher wird auch die Insulinresistenz selbst als ein unabhängiger Risikofaktor für Herzinsuffizienz betrachtet (Paternostro *et al.* 1996, Abel 2005, Doehner *et al.* 2005, Ingelsson *et al.* 2005). Ein zugrundeliegender Mechanismus ist möglicherweise eine normale Insulinempfindlichkeit am Herzen bei systemischer Insulinresistenz. Die erhöhten Insulinspiegel im Blut lösen eine gesteigerte Insulinantwort am Herzen (und den Mitochondrien) mit Hypertrophie und ggf. Dysfunktion aus (Stanley *et al.* 1997). Dieser sehr plausible Mechanismus ist aber umstritten (Goyal & Mehta 2013). Wie genau der Mechanismus auch sei, eine zehnjährige Langzeitstudie mit mehr als 5000 Probanden (Framingham-Studie) fand, dass Männer mit Diabetes mellitus Typ II doppelt so häufig an kongestiver Herzinsuffizienz erkrankten, wie nicht-diabetische Teilnehmer. Für Frauen lag das Verhältnis sogar bei 5:1 (Kannel *et al.* 1974). Patienten, die an Diabetes mellitus Typ II erkrankt sind, haben ein besonders hohes Risiko schon frühzeitig eine systolische Funktionseinschränkung des Herzens zu entwickeln und leiden häufig unter stärkeren Symptomen (Gustafsson & Hildebrandt 2001). Es wurde zudem bereits in verschiedenen Studien ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und der mitochondrialen Dysfunktion gezeigt (Kelley *et al.* 2002, Ritov *et al.* 2005).

1.4 Mitochondrienfunktion

Eine mitochondriale Dysfunktion wurde bereits in verschiedenen Modellen für Herzinsuffizienz festgestellt. Dabei wurden reduzierte Aktivitäten der Komplexe I und -II der Elektronentransportkette, die verstärkte ROS-Entstehung und damit verbundene oxidative Schäden sowie Einschränkungen der Fettsäureoxidation beobachtet (Ide *et al.* 1999, Marin-Garcia *et al.* 2001b, a, Moe *et al.* 2004, Doenst *et al.* 2010, Griffiths *et al.* 2010, Schwarzer *et al.* 2014). Klinische Studien konnten den Zusammenhang einer mitochondrialen Dysfunktion mit der Herzinsuffizienz bestätigen (Buchwald *et al.* 1990, Sharov *et al.* 2000, Scheubel *et al.* 2002, Lemieux *et al.* 2011). Eine kontraktile Dysfunktion des Herzens war dabei mit einer mitochondrialen Dysfunktion assoziiert (Schrepper *et al.* 2012, Schwarzer *et al.* 2013). Die mitochondrial verursachte Herzinsuffizienz ist dabei zumeist mit einer Drucküberlastung verbunden (Li & Zhang 2016).

Auf Grund ihrer Lokalisation werden im Muskelgewebe zwei verschiedene Mitochondrien-Subpopulationen unterschieden: interfibrilläre (IFM) und subsarkolemmale (SSM) Mitochondrien (Palmer *et al.* 1977). Sie unterscheiden sich neben ihrer Lage im Myozyt weiterhin durch ihre morphologischen und biochemischen Eigenschaften. IFM/SSM weisen unterschiedlich hohe Respirationsraten und Sensitivität gegenüber Stressoren auf (Holmuhamedov *et al.* 2012). Auch kardiale Drucküberlastung und sportliche Aktivität beeinflussen die respiratorische Kapazität beider Populationen unterschiedlich (Schwarzer *et al.* 2013, Hollander *et al.* 2014). Es wird davon ausgegangen, dass IFM und SSM, bedingt durch ihre Lage im Myozyt, ATP für unterschiedliche zelluläre Prozesse bereitstellen (Palmer *et al.* 1977, Hollander *et al.* 2014). Eine getrennte Beurteilung von IFM und SSM kann Aufschluss über entstandene energetische Defizite des Myozyten während der Herzinsuffizienz geben.

Als Mechanismen der mitochondrialen Dysfunktion werden vor allem die Fehlfunktion (Garnier *et al.* 2003) und eine vermehrte Entkopplung zwischen Oxidation entlang der mitochondrialen Elektronentransportkette (ETC) und Phosphorylierung durch die ATP-Synthase (Murray *et al.* 2008) beschrieben. Weiterhin wird oxidativem Stress (Ide *et al.* 1999) eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kann durch ein Überangebot an Fettsäuren, wie es bei Diabetes mellitus und Übergewicht besteht, verstärkt werden (Boudina & Abel

2006) und somit auch die Insulinempfindlichkeit weiter reduzieren (Koves *et al.* 2008). Folglich scheinen die Mitochondrien in Verbindung mit einer reduzierten Insulinempfindlichkeit sowie einem veränderten oxidativen Metabolismus wichtige Einflussfaktoren bei der Entstehung der Herzinsuffizienz zu sein.

1.4.1 Oxidativer Stress

Parallel zur mitochondrialen Dysfunktion wurde während der Entwicklung der Herzinsuffizienz eine gesteigerte mitochondriale Produktion von ROS beobachtet (Schwarzer *et al.* 2014). ROS können direkt mit Makromolekülen wie Membranbestandteilen oder DNA reagieren und diese schädigen (Tsutsui *et al.* 2009, 2011). Dadurch betroffen sind im Besonderen auch die Mitochondrien selbst. Irreparable Schäden stehen dabei in Zusammenhang mit einer mitochondrialen Dysfunktion und werden als eine mögliche Ursache bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz gesehen (Dai *et al.* 2011). Das antioxidative System wandelt entstehende ROS in weniger reaktive Radikale um oder eliminiert sie komplett. Antioxidative Enzyme stellen dabei den Hauptanteil der antioxidativen Abwehr dar (Sies 2015). Sie sind somit von großer Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Mitochondrienfunktion und dem Schutz zellulärer Makromoleküle (Belch *et al.* 1991, Hill & Singal 1996). Als bedeutendste antioxidative Enzyme gelten die Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase (GPx). Eine veränderte Aktivität der Enzyme kann Aufschluss über eine während der Herzinsuffizienz gesteigerte oxidative Belastung geben.

Zur Untersuchung der komplexen Zusammenhänge der Entstehung einer Herzinsuffizienz oder dem Einfluss genetischer Züchtung auf den kardialen und metabolischen Phänotyp werden häufig Tiermodelle genutzt. Sie ermöglichen eine umfangreiche Charakterisierung dieser Erkrankungen und erlauben zudem Interventionen. Im Folgenden sollen kurz die in dieser Arbeit verwendeten Tiermodelle beschrieben werden.

1.5 Drucküberlastung und Herzinsuffizienz bei der Ratte

Abbildung 1 zeigt schematisch den Verlauf der Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei Sprague Dawley-Ratten (SD) bei Drucküberlastung (Doenst *et al.* 2010, Schrepper *et al.* 2012, Schwarzer *et al.* 2013, Nguyen *et al.* 2018). Tiere, bei denen durch eine

transverse Aortenkonstriktion (TAC) eine kardiale Drucküberlastung induziert wurde, entwickelten nach zwei Wochen eine Hypertrophie. Diese war von einer diastolischen Funktionseinschränkung nach sechs Wochen und einer systolischen Herzinsuffizienz nach ca. 20 Wochen TAC gefolgt.

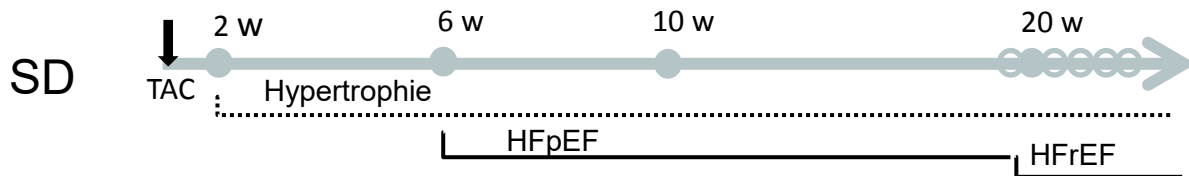


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Stadien der Herzinsuffizienz im Verlauf ihrer Entstehung am Beispiel von Sprague Dawley Ratten. Schematisiert nach (Schrepper *et al.* 2012)

In diesem Modell wurde der besondere Einfluss der Mitochondrien deutlich. Es zeigte sich eine zunächst gesteigerte respiratorische Kapazität, die von erhöhter ROS-Entstehung begleitet wurde. Im Verlauf von HFpEF und HFrEF nahm die respiratorische Kapazität leicht ab, die ROS Produktion blieb jedoch erhöht. TAC führte außerdem zu einer reduzierten kardialen Insulinempfindlichkeit ohne Einfluss auf die systemische Insulinempfindlichkeit.

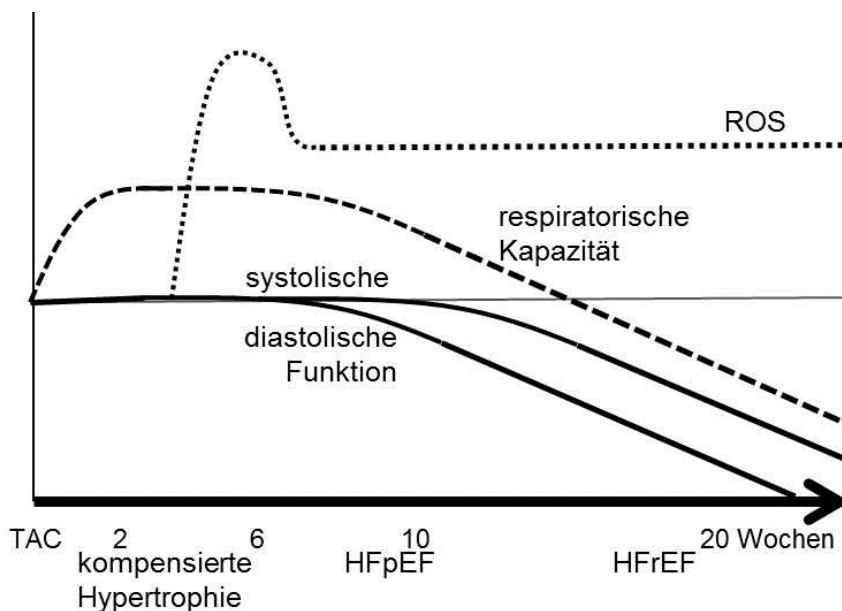


Abbildung 2 Schematische Darstellung von kardialer und mitochondrialer Funktion und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im zeitlichen Verlauf nach transverser Aortenkonstriktion (TAC). HFpEF-Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion, HFrEF-Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (Schrepper *et al.* 2012, Schwarzer *et al.* 2014). Verändert nach Lunkenbein *et al.* (2010)

Dieses Modell eignet sich somit hervorragend für die Untersuchung der Zusammenhänge von Pumpfunktion, Mitochondrienfunktion und Insulinempfindlichkeit bei Drucküberlastung und Entstehung einer Herzinsuffizienz. Experimentelle Untersuchungen weisen auf eine entscheidende Bedeutung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei der Entstehung der Herzinsuffizienz hin. Niedrige körperliche Leistungsfähigkeit wird dabei als stärkster Risikofaktor für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz beschrieben (Lee *et al.* 2012).

1.5.1 Das Modell der High capacity runners und Low capacity runners

Körperliche Leistungsfähigkeit besteht aus zwei Komponenten: extrinsische und intrinsische Ausdauerkapazität. Während erstere erworben wird und durch sportliche Aktivität beeinflussbar ist, ist die intrinsische Ausdauerkapazität eines Individuums genetisch bedingt. Das Modell der *High capacity runners* (HCR) und *Low capacity runners* (LCR) bietet die Möglichkeit Untersuchungen zum Einfluss von genetisch bedingter Ausdauerkapazität getrennt von extrinsischen Einflüssen zu untersuchen. Bei dem durch Koch and Britton (2001), (2005) geschaffenen Modell handelt es sich um eine Ratten-Auszucht von Tieren, die eine hohe Ausdauerkapazität besitzen, und ihren Gegenstücken mit niedriger Ausdauerkapazität. Ratten eines heterogenen Wildtypstamms (N:NIH) wurden bezüglich ihrer Laufkapazität (Dauer, Strecke, maximale Geschwindigkeit) getestet. Jeweils die besten Läufer wurden daraufhin verpaart und entwickelten über mehrere Generationen hinweg die Linie der HCR. Die Verpaarung der schlechtesten Läufer bildete analog die Linie der LCR.

LCR haben eine deutlich geringere Laufkapazität als HCR und entwickeln einen Phänotyp, der dem des Metabolischen Syndroms gleicht (Noland *et al.* 2007). Im Vergleich zu HCR sind sie insulinresistent, weisen Hyperisulinämie sowie höhere Nüchternblutglukose und eine reduzierte Glukosetoleranz auf. Zudem haben LCR mehr viszerale Fett, höhere Plasmatriglyceride und erhöhte freie Fettsäuren und höheren Blutdruck (Wisløff *et al.* 2005). Die genetisch bedingte Prädisposition für niedrige Ausdauerkapazität der LCR-Ratten bringt demnach mehrere Risikofaktoren für die Entstehung einer Herzinsuffizienz mit sich. LCR stellen mit diesem komplexen Phänotyp ein sehr gutes Modell zur Untersuchung der Herzinsuffizienz dar, indem sowohl genetische als auch Lebensstil assoziierte Risikofaktoren Einfluss finden. Es wurde weiterhin bereits gezeigt, dass LCR Proteine, die mit mitochondrialer

Biogenese und Aktivität in Verbindung gebracht werden, vermindert exprimieren (Koch & Britton 2005). Im Skelettmuskel unterscheidet sich zudem auch die respiratorische Kapazität der Atmungskette. HCR zeigen dabei eine höhere respiratorische Kapazität als LCR (Walsh *et al.* 2006). Im Herzmuskel wurde dies bisher nicht untersucht. Es existieren zudem weder Daten zur kardialen Funktion noch zur respiratorischen Kapazität kardialer Mitochondrien von HCR und LCR. Es ist nicht bekannt wie sich die genetische Prädisposition für hohe und niedrige Ausdauerkapazität auf die Entwicklung einer Herzinsuffizienz auswirkt.

Ziel der Arbeit

Es ist das Ziel dieser Arbeit durch eine Kombination der beiden oben beschriebenen Tiermodelle die Rolle der genetischen Prädisposition für aerobe Laufkapazität auf die Mitochondrienfunktion, die Insulinempfindlichkeit und die Pumpfunktion bei Drucküberlastung zu untersuchen.

Es sollen die folgenden Hypothesen getestet werden:

- HCR überleben eine durch Drucküberlastung induzierte Herzinsuffizienz länger als LCR.
- LCR weisen aufgrund ihrer niedrigen Ausdauerkapazität und der damit verbundenen Risikofaktoren frühzeitiger und stärker ausgeprägte kardiale Einschränkungen auf.

Abbildung 3 ist eine schematische Illustration der erwarteten Ergebnisse.

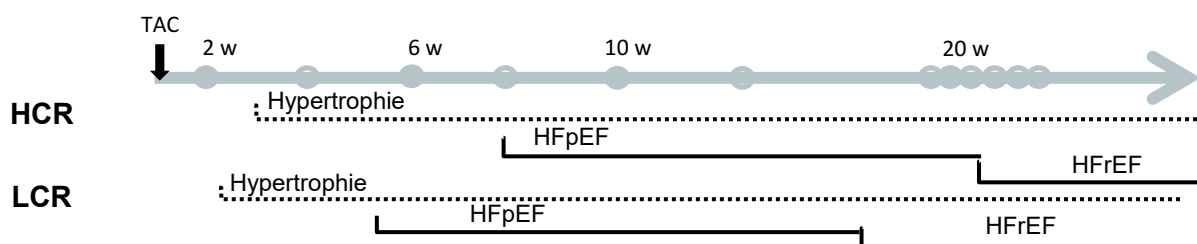


Abbildung 3 Prognostizierte Herzinsuffizienzentwicklung bei HCR und LCR Ratten während kardialer Drucküberlastung

2 Methodik

2.1 Tiermodell

Alle durchgeführten Versuche sind im Rahmen des Tierversuchsvorhabens Nummer 22-2684-04-02-050/13 genehmigt worden. Für alle durchgeführten Versuche wurden Ratten des von Lauren Koch und Steven Britton entwickelten Rattenmodells der *High capacity runners* (HCR) und *Low capacity runners* (LCR) genutzt (Koch & Britton 2001). Dabei wurden ausschließlich die männlichen Nachkommen definierter Zuchtpaare der 33. und 36. Generation verwendet.

2.2 Studiendesign

In Abbildung 4 ist das Studiendesign schematisch dargestellt. Zuchtpaare der Linien HCR und LCR wurden nach definiertem Zuchtplan verpaart. Zum Zeitpunkt „0-Wochen“ bei Absetzen der Jungtiere wurde an männlichen Nachkommen der HCR und LCR Zuchtpaare eine transverse Aortenkonstriktion durchgeführt, die die kardiale Nachlast erhöht und eine Herzinsuffizienz provoziert. Anschließend erfolgte nach zwei, sechs und zehn Wochen die routinemäßige Untersuchung der kardialen Funktion. Die Untersuchungsintervalle wurden mit erwartetem Auftreten der systolischen Dysfunktion kürzer bis diese diagnostiziert wurde.

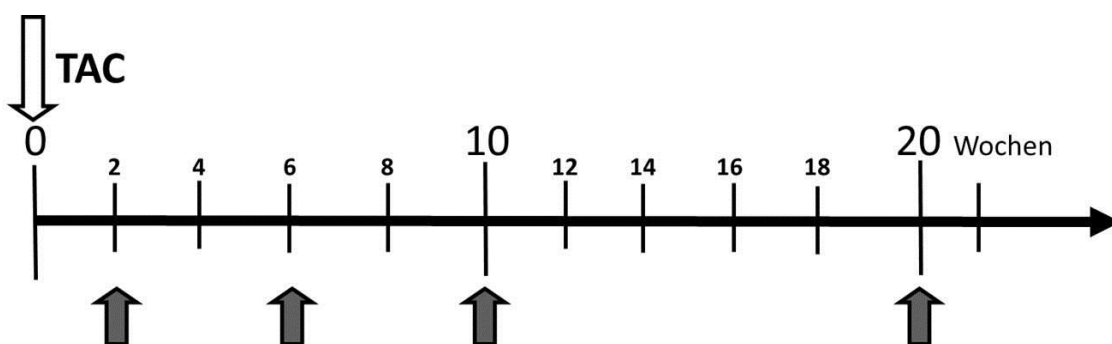


Abbildung 4 Studiendesign

Tabelle 1 fasst die die weiteren Untersuchungen entsprechend der angegebenen Zeitpunkte zusammen.

Tabelle 1 Zeitpunkte einzelner Untersuchungen

Untersuchung	Zeitpunkt nach TAC			
	2 Wochen	6 Wochen	10 Wochen	20 Wochen
Ausdauerkapazität			X	
Echokardiografie	X	X	X	X
Glukosetoleranz			X	X
Proteinanalytik				X
Mitochondriale Morphometrie	X		X	X
Citratsynthaseaktivität	X		X	X
Mitochondriale Funktion	X		X	X
Carnitin-Palmitoyltransferase	X		X	
Antioxidative Enzyme			X	X
Isolierte Herzperfusion	X		X	
Histologie			X	

2.3 Aerobe Ausdauerkapazität

Zur Beurteilung der phänotypischen Ausdauerkapazität wurden HCR und LCR nach etabliertem Protokoll auf ihre aerobe Laufkapazität getestet (Hoydal *et al.* 2007). Gesunde HCR und LCR wurden hierfür im Alter von zehn Wochen zunächst durch kurze, langsame Lafeinheiten über drei Tage hinweg an das Laufband gewöhnt. Die Ausdauer tests erfolgten ach 15-minütiger Gewöhnung mit geringer Geschwindigkeit: HCR [13 m/min] und LCR [9 m/min]) bei einer Neigung von 25°. Die Geschwindigkeit wurde zweiminütlich um 1,8 m/min gesteigert bis der Erschöpfungszustand beobachtet wurde. Tabelle 12 im Anhang zeigt definierte Abbruchkriterien. Es wurde bereits gezeigt, dass das Erreichen der letzten Stufen dieses Tests nur unter anaeroben Bedingungen (ohne $V_{O_{2max}}$ -Anstieg) möglich ist. Die maximale aerobe Leistungsfähigkeit wurde demnach wie durch Hoydal *et al.* (2007) beschrieben durch Abzug von pauschal vier der maximal erreichten Stufen bestimmt.

2.4 Transverse Aortenkonstriktion

Die transverse Aortenkonstriktion (TAC) dient der Erzeugung einer Stenose der Aorta, welche bei heranwachsenden Tieren nach und nach zu Erhöhung der Nachlast des linken Ventrikels und somit zu dessen Hypertrophie und final zu einer Herzinsuffizienz führt. Die Narkose und Analgesie für die Operation bestand aus 0,25 mg Ketamin und 0,05 mg Xylazin/10 g Ratte. Gegenüber gängigen Dosierungsempfehlungen wurde die Ketamindosis leicht reduziert, was eine starke Senkung der Herz- und Atemfrequenz während der OP verhindern konnte (Giroux *et al.* 2015). Alle Tiere wurden postoperativ mit Metamizol (0,25 g/100 ml) im

Trinkwasser für drei Tage analgesiert. Die Aortenstenose wurde bei drei Wochen alten Tieren mit einem Körpergewicht von 30-50 g erzeugt indem ein Ligaturclip zwischen *Truncus brachiocephalicus* und der linken *Arteria carotis communis* um den Aortenbogen appliziert wurde. Die Operation erfolgte nach etabliertem Protokoll der Arbeitsgruppe (Doenst *et al.* 2010, Schrepper *et al.* 2012, Nguyen *et al.* 2013, Schwarzer *et al.* 2014). Hierfür wurden Ratten zunächst narkotisiert und auf einer Wärmeplatte fixiert. Im ersten Schritt wurde ein Hautschnitt zwischen Larynx und *Processus xiphoideus* gesetzt. Die Ratte wurde anschließend mit einer 16G Kanüle intubiert und während der Dauer der Operation mit Raumluft beatmet (1 ml/Zyklus, 100 Zyklen/min). Die Öffnung des Thorax erfolgte über eine partielle Sternotomie. Nachfolgend wurden die Aorta von Thymus-, Fett- und umgebendem Bindegewebe freipräpariert und der *Truncus brachiocephalicus* sowie die *Arteria carotis communis* dargestellt. Ein Ligaturclip wurde mittels einer justierten Zange genau zwischen beide Arterien um die Aorta gelegt und auf ein verbleibendes Lumen von 0,35 mm Durchmesser geschlossen. Das Sternum wurde mit durch die Zwischenrippenräume gebundenem Nahtmaterial geschlossen. Abschließend erfolgte eine Hautnaht mit einer doppelten, fortlaufenden Naht.

2.5 Überlebenszeitanalyse

Es wurden alle Tiere, die eine TAC erhielten, dokumentiert und in die Überlebenszeitanalyse eingeschlossen. Tiere, die bereits nach weniger als einer Woche post operativ verstarben, wurden ausgeschlossen, da es sich hier vorrangig um eine postoperative Sterblichkeit handelte, die keine Auskunft über die Sterblichkeit durch Drücküberlastung lieferte. Tiere, die vorzeitig in finale Versuche aufgenommen wurden, wurden bis dahin erfasst und anschließend als zensiert dokumentiert. Unterschiede in der Überlebensdauer nach TAC zwischen HCR und LCR wurden mittels Log-Rank Analyse ermittelt.

2.6 Echokardiografie

Eine leichte Isoflurannarkose diente der Stressminimierung und Ruhigstellung der Tiere. Sie wurde mit 5% eingeleitet und während der Untersuchung bei 2% gehalten. Zur Darstellung der diastolischen Funktion wurde zusätzlich mittels Medetomidin (Dormitor) die Herzfrequenz auf ca. 300 Schläge/Minute gesenkt. Narkotisierte Tiere wurden im Bereich des linken Brustkorbs rasiert und in Rückenlage auf einer

Wärmeplatte mit EKG-Ableitern fixiert. Am Echokardiographiegerät Vevo770 der Firma VisualSonics® wurden mittels 17,5 Mhz RMV716 Schallkopf (VisualSonics®) anschließend im Bildmodus Längs- und Querschnittaufnahmen des linken Ventrikels auf Höhe der Papillarmuskeln erzeugt und gespeichert. Die in Abbildung 5 exemplarisch dargestellten M-Modeaufnahmen des Ventrikels dienten der Messung von systolischer und diastolischer Wanddicken sowie des jeweiligen Ventrikellinnendurchmessers (Zaha *et al.* 2003). Die Messungen erfolgten gemäß der Empfehlungen von Sahn *et al.* (1978) und Buck *et al.* (2009). Abbildung 6 zeigt kurze Sequenzen der Herzkontraktion, die mittels Gewebedoppler und gepulstem Doppler (PW-Doppler) des Gerätes aufgenommen und gespeichert wurden und zur Auswertung der Ventrikel elastizität und Flussraten der diastolischen Funktion dienten. Tabelle 2 fasst Parameter und daraus resultierende Größen zusammen, die neben der Herzfrequenz und dem Körpergewicht zur Charakterisierung der Herzfunktion gemessen wurden.

Tabelle 2 Parameter des linken Ventrikels mit Messmethode und Berechnung

Parameter	Abkürzung	Einheit	Modus/Berechnung
Vorderwanddicke			
Systole	LVAW,s	mm	M-Mode
Diastole	LVAW,d	mm	
Hinterwanddickel			
Systole	LVPW,s	mm	M-Mode
Diastole	LVPW,d	mm	
Innendurchmesser			
endsystolisch	LVID,s	mm	M-Mode
enddiastolisch	LVID,d	mm	
Ventrikelvolumen			
Systole	LVV,s	µl	$=7/(2,4+LVID,s)*LVID,s^3$
Diastole	LVV,d	µl	$=7/(2,4+LVID,d)*LVID,d^3$
Ventrikelmasse	LVM	mg	$=1,04*(LVAW,d+LVPW,d+LVID,d)^3-LVID,d^3$
Massenindex	LVMi	g/kg	$=LVM/Körpergewicht$
passiver Einstrom	E	mm/s	PW-Doppler
aktiver Einstrom	A	mm/s	PW-Doppler
Dezelerationszeit	DT	ms	PW-Doppler
Myokardbewegung			
passiv	e'	mm/s	Gewebedoppler
aktiv	A'	mm/s	
Auswurffraktion	EF	%	$=(LVV,d-LVV,s)*100$
Verkürzungsfraktion	FS	%	$=(LVID,d-LVID,s)/LVID,d*100$

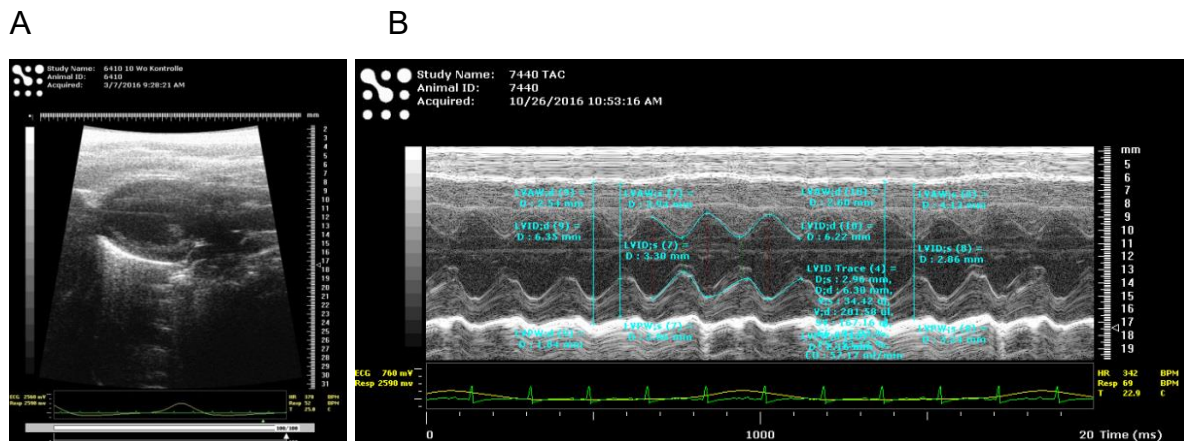


Abbildung 5 Echokardiografische Darstellung des linken Ventrikels: (A) Längsschnitt im Bild-Modus und (B) Längsschnitt im M-Modus: Messungen der Morphometrie und systolischen Funktion

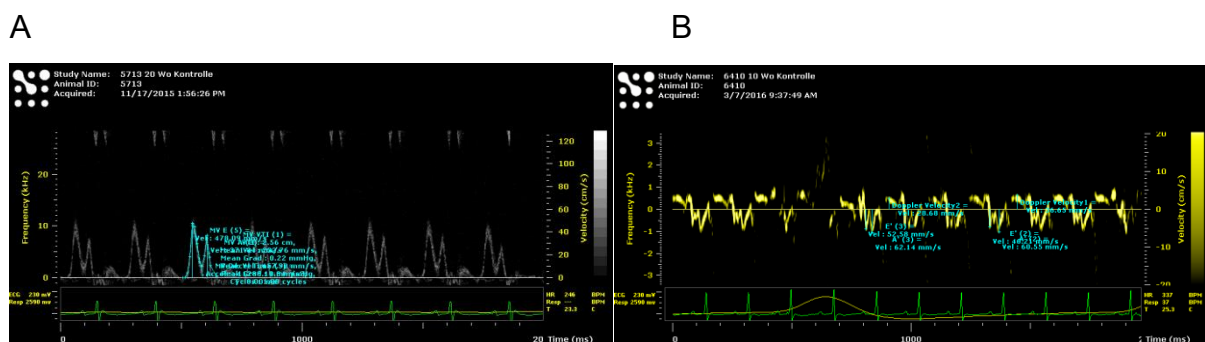


Abbildung 6 Diastolische Funktion: PW-Modus und Gewebedoppler : (A) Messung der E- und A-Welle und der Dezelerationszeit und (B) Messung von e'-/A'-Welle

2.7 Glukosetoleranz

Nach zehn und 20 Wochen wurden die Nüchternblutglukose und die Glukosetoleranz bei Kontroll- und TAC-Tieren bestimmt. Die Blutentnahme erfolgte aus den Fußkapillaren. Für jede Messung wurde ein Tropfen Blut entnommen. Der Blutglukosespiegel wurde mit Hilfe des kommerziellen Blutzuckermessgerätes FreeStyle und zugehöriger Teststreifen bestimmt und in [mmo/L] angegeben. Diese Toleranztests dienten der Detektion einer gestörten Glukoseverwertung. Hierzu wurde der über sechs Stunden gefasteten Ratte 2 g/kg Glukose i.p. verabreicht. Der Blutglukosespiegel wurde nach 0, 15, 30, 60, 120, 180 min gemessen und dessen Abfall grafisch dargestellt.

2.8 Organentnahme

Für finale Experimente wurden die Tiere mit 0,4 g/kg Thiopenthal i.p. narkotisiert. Das Körpergewicht, sowie die Organgewichte von Herz, Vorhöfen, Lunge, Leber,

epididymalem Fettgewebe und der Skelettmuskel *M. gastrocnemius* und *M. soleus* wurden dokumentiert. Zusätzlich wurde die Länge der linken Tibia gemessen. Entnommenen Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° gelagert.

2.9 Proteinanalytik

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden für die Durchführung von Western Blots zur Analyse der Expression spezieller Proteine verwendet.

Stammlösungen	10% Triton-X 100 1 M TrisHCl, pH 7,5 2 M NaCl 0,5 M NaF 0,25 M Na ₄ P ₂ O ₇	Coomassie-Lsg. (in 100 ml H ₂ O)	25 ml Isopropanol (99,7%) 10 ml Essigsäure (100%) 50 mg Coomassie
Probenpuffer	20 mM Tris 7,5 50 mM NaCl 25 mM NaF 12,5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 44 mM PMSF 2 mM Na ₃ VO ₄ 1% Triton-X 1 Tbl./10ml Complete	Lämmli 3x (in 100 ml H ₂ O)	2,1 g DTT ¹ 1,1 g EDTA 0,36 g Tris-HCl 10,0 g SDS 40,0 ml Glycerol 2,0 ml Brom-phenolblau (1%)
Trenngelpuffer (TG-P)	0,36 M Tris-HCl 1,14 M Tris Base 0,4% SDS-Lsg →pH 8,8	Sammelgelpuffer (SG-P)	0,48 M Tris-HCl 16 mM Tris Base 0,4% SDS-Lsg
Ablösepuffer	1 M Glycin pH 1,8	Blockier-Lsg.	5% Milchpulver in TBS-T
TBS 10x Stamm-Lsg. (1 L)	87,6 g NaCl 60,5 g Tris →pH 8,0	TBS-T	1:10 TBS 1:1000 Tween
Transferbuffer 10x Stamm-Lsg. (1 L)	30 g Tris Base 2 g SDS 141 g Glycin	Laufpuffer 10x Stamm-Lsg. (1 L)	144 g Glycin 10 g SDS 30 g Trizma Base
Chemilumineszenz	Serva Reagenz 1:1000 H ₂ O ₂	APS ²	100 mg/ml

¹ DTT: Dithiothreitol

² APS: Ammonium Persulfate

Bei -80°C gelagerte Herzgewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff zu Pulver gemörsernt. Davon wurden 50 mg in 450 µl Probenpuffer aufgenommen, homogenisiert und bei 16000xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach Quantifizierung der Gesamtproteinmenge (Abschnitt 2.13) wurden alle Gewebeproben mit Lämmli-Puffer angesetzt und mit Wasser auf 4 µg/µl verdünnt. Die Elektrophorese wurde bei 40 mA/Gel für ca. 1 h durchgeführt. Zur Proteinauftrennung wurden 5%-ige Sammelgel und Trenngele mit 7,5% (IR und p-IR) und 10% (Akt, p-Akt und GLUT-4) genutzt:

Tabelle 3 Zusammensetzung des Elektrophoresegels

		Sammelgel	Trenngel	
		5,0%	7,5%	10,0%
H ₂ O	ml	2,88	2,46	2,05
Polyacrylamid (30%)	ml	0,83	1,25	1,67
TG-P	ml		1,25	1,25
SG-P	ml	1,25		
TEMED ³	µl	5	5	5
APS	µl	33	33	33

Die Proteine wurden anschließend mittels Western Blot bei 13 V für 2 h auf eine PVDF⁴-Membran übertragen. Die Membranen wurden kurz gespült (TBS-T) und 1 h mit Blockierlösung inkubiert. Sie wurde nach wiederholtem Waschen mit den spezifischen Primärantikörpern inkubiert. Membranen wurden über Nacht bei 4°C mit Primärantikörpern mit einer Verdünnung von 1:1000 in TBS +5% BSA inkubiert. Die folgenden Primärantikörper der Firma Cell Signalling wurden genutzt: Anti-Akt (#92726), Anti-p-Akt (#9271S), Anti-IRβ (#3025), Anti-p-Rβ (#3024S). Weiterhin wurde eine Membran mit Anti-Glut-4 (#07-1404, Millipore) inkubiert. Anti-GAPDH (#ab7269, AbChem) wurde für alle Auswertung als Referenzprotein genutzt. Nach einem wiederholten Waschschrift wurde Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Anti-rabbit Sekundärantikörper (#NA934V, ECL IgG, 1:40000 in TBS-T) in Kombination mit einem Chemilumineszenz-Reagenz (SERVA) zur Detektion aller Proteine genutzt. Die Auswertung/Quantifizierung spezifischer Banden erfolgte mittels ImageJ-Software. Nach anschließendem Ablösen eingesetzter Primärantikörper, erfolgte eine erneute Blockierung und Inkubation der Membran mit einem weiteren Primär- und Sekundärantikörper.

³ TEMED: Tetramethylethylenediamine

⁴ PVDF: Polyvinyliden-difluorid

Zur Isolation frischer Mitochondrien aus Herz-, Skelettmuskel- und Lebergewebe wurden die folgenden Puffer verwendet:

Chappel-Perry-Puffer 1 (CP1)	100 mM KCl 50 mM MOPS 1 mM EGTA 5 mM MgSO ₄ 1 mM ATP → pH 7,4	Isolationspuffer	200 mM Mannitol 10 mM Sucrose 5 mM Hepes 1 mM EGTA → pH 7,4
Chappel-Perry-Puffer 2 (CP2)	CP1 2 mg/ml BSA	Waschpuffer	200 mM Mannitol 10 mM Sucrose 5 mM Hepes → pH 7,4
		KME-Puffer	100 mM KCl 50 mM MOPS 0,5 mM EGTA → pH 7,4

2.10.2 Durchflusszytometrie

Isolierte Mitochondrien wurden getrennt nach Gewebe und Population mit Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Die Mitochondrien wurden hierfür mit KME-Puffer 1:1000 verdünnt und mittels Durchflusszytometer FC500 der Firma Beckman Coulter durch Partikelgröße (Forward Scatter) und Komplexität (Sideward Scatter) beschrieben. Im Messprotokoll wurden 10000 Partikel oder 150 Sekunden Messdauer als Obergrenze für jede Messung voreingestellt.

2.10.3 Citratsynthaseaktivität

Die Messung der Citratsynthaseaktivität erfolgte bei 25°C und unmittelbar nach der Isolation der Mitochondrien nach einem Protokoll von Srere *et al.* (1963). Das zu Beginn der Isolation gewonnene Homogenat, sowie isolierte Leber- und IFM/SSM-Mitochondrien aus Herz und *M. gastrocnemius* wurden mittels KEA-Puffer verdünnt und jeweils zur Hälfte mit 0,9%-iger Kochsalzlösung (NaCl) oder mit 5% Triton inkubiert. In Gegenwart von Acetyl-CoA wurde durch Zugabe von Oxalacetat die Reaktion der Citratsynthase gestartet. Während dieser Reaktion freiwerdendes CoA-SH bindet direkt an den zugegebenen Farbstoff 5,5'-dithiobis-(2nitrobenzoesäure) (DTNB). Dem Entstehen des resultierenden

Mercaptids konnte bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch gefolgt werden. NaCl behandelte Proben gaben dabei Aufschluss über die freie Citratsynthaseaktivität, Triton behandelte durch eine Lyse der Membran über die Gesamtaktivität. Aus deren Differenz ergab sich die latente Aktivität des Enzyms.

KEA-Puffer	180 mM KCl 10 mM EDTA 0,5% BSA → pH 7,4	Substrate	125 µM Acetyl-CoA 500 µM Oxalacetat 100 µM DTNB
------------	--	-----------	---

2.10.4 Messung der respiratorischen Kapazität der Mitochondrien

Die Aktivität der mitochondrialen Respiration wurde durch polarographische Messung an isolierten Mitochondrien mit der Clark-Elektrode gemessen (Clark *et al.* 1953, Schrepper *et al.* 2012). Die in Abbildung 8 dargestellten Substrate werden mittels spezifischer Transporter in das Mitochondrium transportiert. Ihre im Citratzyklus gebildeten Reaktionsäquivalente NADH und FADH₂ werden an Komplex I und –II der Atmungskette oxidiert. Sie liefern den Komplexen dabei Protonen, die in den Intermembranraum des Mitochondriums gepumpt werden. Ihr Rückfluss dient dem Antrieb der ATPase zur Generierung von ATP. Elektronen werden unter Bildung von Wasser an Komplex IV auf Wasserstoff übertragen. Der Verbrauch des dabei benötigten Sauerstoffs spiegelt die Umsatzrate der Substrate wider.

Die Messungen erfolgten bei konstant 25°C. Für die Messung wurden Mitochondrien stets mit der Menge, die einer Citratsynthaseaktivität von 1 U/ml entspricht, eingesetzt. Isolierte Mitochondrien wurden unter permanentem Rühren mit verschiedenen Substrat- und Inhibitorvarianten in 1 ml Respirationsgemisch in der Messkammer inkubiert. Abbildung 8 zeigt schematisch die Aufnahme der Substrate in die mitochondriale Matrix und ihren Abbau in der β -Oxidation (Fettsäure) und dem Citratzyklus. Ihre Reaktionsäquivalente werden entsprechend den Komplexen I und II der Elektronentransportkette zugeführt.

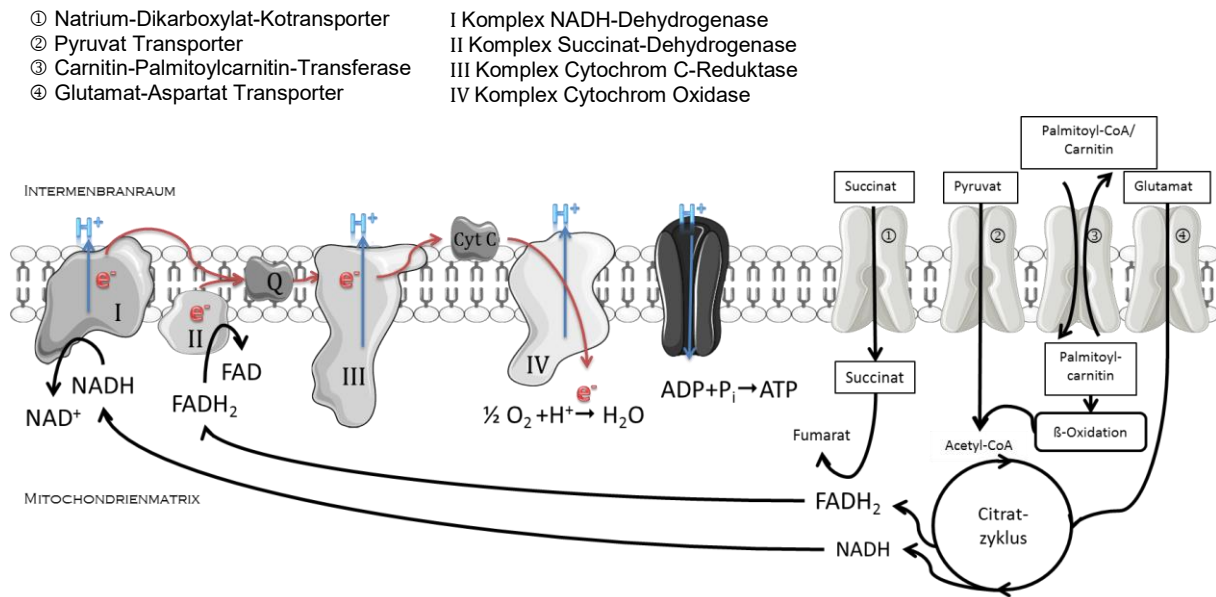


Abbildung 8 Mitochondriale Atmungskette und Transporter der Substrate

Die folgenden Puffer, Substrate und Inhibitoren wurden in der Messung eingesetzt.

Respirations-Medium	100 mM KCl 50 mM Mops 1 mM EGTA 5 mM KH ₂ PO ₄ 1 mg/ml BSA, entfettet	Substrate	2 mM NADH 10 mM ADP 100 mM ADP 1 M Succinat 50 mM DHQ ⁵ 25 mM TMPD ⁶
Inhibitoren	0,75 mM Rotenon 0,1 M Na-Azid	Substrat-kombination	0,5 M Malat/ 1 M Pyruvat
Entkoppler	10 mM DNP ⁷		0,5 M Malat/ 1 M Glutamat 0,5 M Malat/ 2 mM Palmitoylcarnitin 0,5 M Malat/ 0,1 M Carnitin 2 mM Palmitoyl CoA

Abbildung 9 bildet die unterschiedlichen Stadien der Messung der respiratorischen Kapazität der Mitochondrien ab. Der erste Schritt der Messung (State 2) stellte die substratmotivierte Atmung dar. Die anschließende Zugabe von 1 mM ADP führte zur ADP-stimulierten Respiration (State 3) und diente der Auswertung der maximalen respiratorischen Kapazität der Mitochondrien. Nach vollständiger Phosphorylierung

⁵ Tetramethylhydroquinone (DHQ)

⁶ N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD)

⁷ Dinitrophenol (DNP)

des ADP zu ATP schloss sich die ADP-limitierte Atmung (State 4) an. Sie kann Hinweise auf unspezifische Hydrolyseaktivität durch ATPasen oder unspezifischen Protonenverlust über die Membran geben (Brand & Nicholls 2011, Gnaiger 2014). Eine erneute Stimulation mit 100 mM ADP und die Zugabe des Entkopplers Dinitrophenol (DNP) gaben Aufschluss über die Kopplung der Atmungskettenkomplexe und die Intaktheit des Protonengradienten über die Mitochondrienmembran.

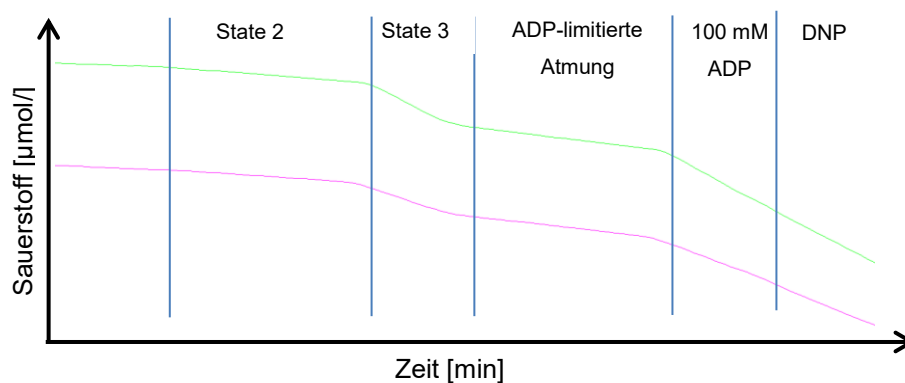


Abbildung 9 Schematische Darstellung einer Messung der respiratorischen Kapazität isolierter Mitochondrien

2.11 ADP-limitierte Respiration

Die ADP-limitierte Respiration entsteht durch den Verbrauch des gesamten zur Verfügung stehenden ADPs. Ist ein ATP/ADP-Gleichgewicht entstanden, wird der Protoneneintritt gehemmt und die Phosphorylierung bricht ab. Die mitochondriale Respiration wird darauf hin verlangsamt und es ergibt sich eine im Vergleich zur maximalen Respiration (State 3) stark reduzierte ADP-limitierte Respiration (State 4) (Brand & Nicholls 2011).

2.12 ADP/O-Verhältnis

Die Konzentration des verbrauchten Sauerstoffs ist in gut gekoppelten Mitochondrien proportional zur Menge phosphorylierter ATPs (Chance & Williams 1955, Estabrook 1967). ADP/O gibt das Verhältnis zwischen phosphorylierten ADP-Molekülen und verbrauchtem Sauerstoffatom wider. Es ist sowohl von der Oxidation als auch der Phosphorylierung abhängig und stellt somit ein Maß für die Effizienz des Mitochondriums dar. Das ADP/O wird über die Menge verbrauchten Sauerstoffs während der mit einer bekannten Menge ADP stimulierten Respiration ermittelt.

2.13 Quantifizierung des Gesamtproteins

Der absolute Proteingehalt isolierter Mitochondrien und von aufgearbeiteten Gewebeproben wurde ermittelt. Er diente als Bezugsgröße der mitochondrialen Atmung bzw. der gemessenen Enzymaktivitäten und der Expression von einzelnen Zielproteinen. Die Quantifizierung der Proteingehalte erfolgte mittels einer nach Bradford (1976) veränderten Methode. Dabei wurde der Farbstoff Coomassie brilliant blue G-250 genutzt, der an basische und aromatische Aminosäuren bindet und dabei sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm ändert. Die Extinktion von 5 µl mit Wasser verdünnter Proben wurde bei 595 nm photometrisch gemessen. Mittels einer mitgeführten Standardkurve aus Rinderserum-Albumin (0; 0,2, 0,4, 0,6; 0,8; 1,0 mg/ml) wurde anschließend die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

2.14 Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase

Die Aktivitätsmessung der Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) erfolgt ähnlich der Messung der Citratsynthaseaktivität über die Extinktion des Farbstoffs DTNB. Die Durchführung erfolgte basierend auf der durch Bieber *et al.* (1972) beschriebenen Methode unter Berücksichtigung von Anpassungen nach Hassett and Crockett (2000). Auch bei der Synthese von Palmitoyl-CoA und L-Carnitin zu Palmitoylcarnitin werden SH-Gruppen des CoA-SH frei und reagieren stöchiometrisch mit DTNB. Der Freisetzung des resultierenden Mercaptid-Anions wurde bei $\lambda=412$ nm über eine Dauer von 10 min photometrisch gefolgt. Hierzu wurden 10 µl Probe mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml mit 185 µl Messpuffer inkubiert und als Hintergrund gemessen. Die Zugabe von 10 µl des 700 µM Palmitoyl-CoA startete die Reaktion.

Messpuffer	40 mM Hepes
	1 mM EDTA
	2 mM MgCl ₂
	0,33 µM DTNB
	1,67 µM Carnitin
	→ pH 7,4

2.15 Antioxidative Enzymaktivität – Probenvorbereitung

Zur Messung der Katalase- und SOD-Aktivität wurde tiefgefrorenes Herzpulver in eiskaltem Lysepuffer aufgenommen (1 mg Gewebe/10 µl Lyse- Puffer), bei 750 rpm für 30 Sekunden homogenisiert und für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert. Der

Überstand wurde bis zur Messung bei -20°C gelagert. Zur Messung der GPx-Aktivität wurden diese Überstände erneut für 15 min bei 10000 x g zentrifugiert und die resultierenden neuen Überstände für die Messung verwendet.

Lysepuffer	0,1 M K ₂ HPO ₄ 2 mM EDTA 2 Proteaseinhibitor- Tabletten → pH 7,4
------------	---

2.15.1 Katalase

Alle Proben und die Positivkontrolle Katalase (je 5 µl) wurden mit 145 µl Phosphatpuffer versetzt. Die Zugabe von 100 µl H₂O₂ startete die Reaktion. Die Abnahme der Extinktion von H₂O₂ bei λ=240 nm über einen Zeitraum von Δ_t=60 sec entsprach der spezifischen Aktivität der Katalase (ε=43,6 mol*L⁻¹*cm⁻¹).

Lösung I	1 M KH ₂ PO ₄ (10ml)	H ₂ O ₂	30 µl 30%ige H ₂ O ₂ in 10 ml Phosphatpuffer
Lösung II	1 M K ₂ HPO ₄ (50 ml)		
Phosphatpuffer	→ pH von Lsg. II mit Lsg. I auf 7,8 einstellen	Katalase (frisch)	400 U/ml in Phosphatpuffer

2.15.2 Superoxid Dismutase

Alle Proben und die 100%-Messung (je 10 µl) wurden mit 280 µl Trispuffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von 10 µl Pyrogallol startete die Reaktion. Die Zunahme der Extinktion durch die Autooxidation von Pyrogallol wurde bei λ=420 nm über einen Zeitraum von Δ_t=60 sec gemessen. Die Aktivität der SOD ergab sich relativ zur 100%-Messung. Entsprechend wurde 1 U Aktivität als 50%-ige Inhibition der Autooxidation von Pyrogallol definiert (Marklund & Marklund 1974).

Tris-Puffer	50 mM Tris- HCl → pH 8,5	Kaliumcyanid	2 mM KCN
		Pyrogallol	10 mM HCL 8 mM Pyrogallol

2.15.3 Glutathion-Peroxidase

Alle Proben (je 15 µl) wurden mit 200 µl Messpuffer für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 10 µl Cumolhydroperoxid startete die Reaktion. Die Abnahme der Extinktion von Cumolhydroperoxid bei $\lambda=340$ nm über einen Zeitraum von $\Delta t=180$ sec entsprach der spezifischen Aktivität der GPx ($\epsilon=0,0062 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Tris-Puffer	50 mM Tris- HCl 0,1 mM EDTA → pH 7,6	Messpuffer	Tris-Puffer 0,2 mM NADPH 9 mM GSH 7,5 U/ml Glutathion- Reduktase
Cumol- hydroperoxid	1,5 mM Cumol- hydroperoxid		

2.16 Isolierte Herzperfusion

Nach zwei und zehn Wochen TAC wurden Herzen aus den Tieren entnommen, in eiskaltem Puffer gespült und zügig von umliegendem Gewebe befreit. Die Aorta wurde kanüliert und zunächst retrograd mit Krebs-Henseleit Puffer perfundiert. Spontan schlagende Herzen wurden anschließend mit Krebs-Henseleit Puffer über linken Vorhof und Aorta im Arbeitsmodus perfundiert (Doenst *et al.* 1999b, Fischer-Rasokat *et al.* 2003, Nguyen *et al.* 2015). Alle Messungen wurden bei 37°C durchgeführt. Die Herzen arbeiteten bei 15 cm Wassersäule Vorlast und 100 cm Wassersäule Nachlast. Substratoxidationsraten wurden fünfminütlich anhand der radioaktiven Marker $^{14}\text{CO}_2$ aus $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ Glukose und $^3\text{H}_2\text{O}$ aus $[9,10\text{-}^3\text{H}]$ Oleat errechnet. Die Herzleistung (CP) wurde im selben Intervall errechnet. Sie ergab sich aus Schlagvolumen, gemessen am Koronarfluss [ml/min], multipliziert mit der Höhe der Wassersäule und dividiert durch den Faktor 612.

$$CP [mW] = \frac{\left(\sum \text{Schlagvolumen} \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right] \right) \times 100 \text{ cm}}{612}$$

Krebs-Henseleit- Puffer	128 mM NaCl 5 mM KCl 1 mM KH_2PO_4 1,3 mM MgSO_4 15 mM NaHCO_3 2,5 mM CaCl_2	Substrate (in Krebs- Henseleit- Puffer)	5 mM Glukose 0,4 mM Na-Oleat 20% BSA
----------------------------	--	--	--

2.17 Histologie

Kollagenfasern sind Bestandteil möglicher struktureller Veränderung (Fibrose) im Ventrikel. Es wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte aus dem mittleren Querschnitt des Ventrikels mit einem kommerziell erhältlichen Masson Trichrom Färbereagens (HT151KT, Sigama Aldrich) gemäß Anleitung gefärbt. Es wurden vier zufällig am Mikroskop (Vergrößerung 10-fach) ausgewählte Areale je Ventrikelschnitt gespeichert und ausgewertet. Der Schwellenwert für alle gefärbten Strukturen des Lungengewebes inklusive infiltrierter Zellen wurde mit der Software ImageJ angepasst. Die Dichte des Lungengewebes wurde als Anteil der Gesamtfläche ermittelt. Zur Bestimmung des interstitiellen, periarteriellen Kollagens wurde ein selektiver Farbschwellenwert für Blaufärbungen genutzt und relative Flächen quantifiziert (Nguyen *et al.* 2013).

2.18 Statistik

Alle angegebenen Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler) angegeben. Ausreißerwerte in den Stichproben der Gruppen wurden mittels Ausreißertest nach Grubbs (1950) detektiert. Unter Verwendung der Statistiksoftware SigmaPlot/SigmaStat wurden nachfolgende Analysen durchgeführt. Das Überleben nach TAC wurde mittels Log-Rank Analyse verglichen. Eine Normalverteilung der Daten wurde mit einem Shapiro-Wilk-Test geprüft. Unterschiede zwischen zwei Gruppen normalverteilter Daten wurden mit dem unpaarigen *Student's* t-Test ermittelt. Im Falle nicht normal verteilter Stichproben wurde mittels Mann-Whitney-U-Test auf statistische Unterschiede getestet. Die mehrfaktorielle Varianzanalyse wurde zum Vergleich mehrerer Zielvariablen genutzt und mit einem Holm-Sidak-Test als Post-hoc-Test kombiniert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Aerobe Ausdauerkapazität

Während der Messung der aeroben Ausdauerkapazität erreichten HCR durchschnittlich eine maximale Geschwindigkeit von $39,3 \pm 0,5$ m/min und LCR von $23,5 \pm 0,2$ m/min. HCR erreichten im Mittel die 14. Stufe des Tests und liefen somit $26,7 \pm 0,2$ min. LCR liefen im Mittel $11,7 \pm 0,1$ min bis zur 5. Stufe des Tests.

3.2 Überlebensanalyse

Die Überlebensanalyse von HCR und LCR mit einer kardialen Drucküberlastung ergab einen signifikanten Überlebensvorteil der LCR gegenüber den HCR ($p=0,03$) (Abbildung 10). Die mittlere Überlebensdauer der LCR betrug $26,32 \pm 1,12$ Wochen und überstieg die der HCR ($20,23 \pm 1,09$ Wochen) deutlich.

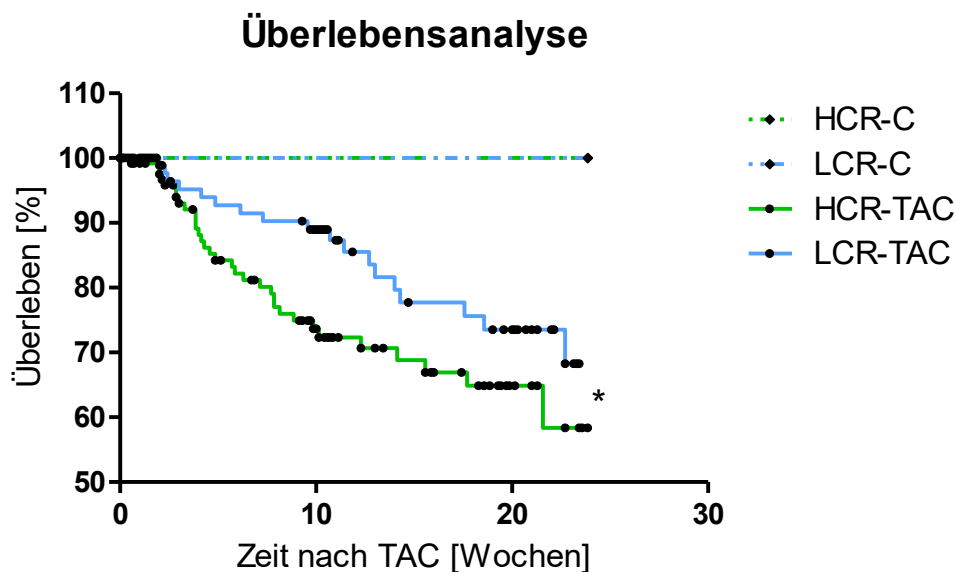


Abbildung 10 Überleben von HCR und LCR während kardialer Drucküberlastung nach Log Rank-Analyse. HCR-*High capacity runners* ($n=150$), LCR-*Low capacity runners* ($n=125$), TAC-transverse Aortenkonstriktion. Zensierte Tiere, die zu entsprechenden Zeitpunkten in weitere Versuche gingen, sind als Punkte markiert. $*p<0,05$

3.3 Kardiale Morphometrie und Funktion

Tabelle 4 fasst die Messgrößen des linken Ventrikels zusammen. Die Herzfrequenz der HCR war zu Beginn des Beobachtungszeitraumes geringer als die der LCR. Mit Erreichen des Erwachsenenalters sank die Frequenz in allen Gruppen. Eine TAC hatte keinen Einfluss auf die Herzfrequenz. TAC führte zunehmend zu kardialer

Hypertrophie, verdeutlicht durch eine Zunahme der linksventrikulären Vorder- und Hinterwandstärken der TAC-Gruppen im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen. Insgesamt führte TAC zu einem frühzeitig starken Anstieg der linksventrikulären Masse was das Voranschreiten der Hypertrophie verdeutlicht. Eine gegenüber der Kontrollgruppe zunehmende Vergrößerung des systolischen Innendurchmessers durch TAC war bei beiden Phänotypen messbar. Eine Reduktion der Wandstärken konnte zwar nicht generell nachgewiesen werden. Eine Dilatation, verdeutlicht durch eine Vergrößerung des systolischen Ventrikelinnendurchmessers, trat jedoch bei beiden Phänotypen auf und war bei HCR stärker als bei LCR.

Tabelle 4 Morphometrie des linken Ventrikels der vier Versuchsgruppen während der Untersuchungszeitpunkte zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen

Parameter	Zeitpunkt [Wochen]	HCR Kontrolle	HCR TAC	LCR Kontrolle	LCR TAC	Statistik		
						P	T	I
Herzfrequenz [Schläge/min]	2	378±10	390±1	439±6	430±9	***	ns	ns
	10	359±7	339±13	373±11	357±10	ns	ns	ns
	20	354±13	352±10	356±15	333±11	ns	ns	ns
LV Masse [mg]	2	416±27	558±31	393±44	494±23	ns	*	ns
	10	621±30	1150±89***	801±62	1312±180***	ns	***	ns
	20	799±40	1188±61**	858±77	1490±131***#	ns	***	ns
LVMI	2	3,88±0,14	6,11±0,22***	3,67±0,40	5,90±0,23***	ns	***	ns
	10	3,14±0,12	6,34±0,54***	3,00±0,17	5,22±0,70***	ns	***	ns
	20	3,22±0,12	5,38±0,30***	2,64±0,16	4,75±0,12***	ns	***	ns
Wandstärke; d [mm]	2	2,92±0,12	3,85±0,12***	2,84±0,10	4,24±0,07***#	ns	***	ns
	10	3,48±0,12	4,62±0,30***	4,32±0,22#	5,28±0,31**#	**	***	ns
	20	4,04±0,15	4,54±0,23	3,97±0,30	5,51±0,27***##	ns	***	*
Wandstärke; s [mm]	2	3,96±0,20	5,59±0,15***	5,21±0,10###	6,29±0,14***##	***	***	ns
	10	5,53±0,13	6,59±0,30**	6,54±0,21##	7,61±0,30***###	***	***	ns
	20	5,89±0,14	6,46±0,32	6,45±0,3	7,69±0,23***###	**	**	ns
LVID;d [mm]	2	6,00±0,13	5,56±0,16*	5,63±0,13	4,58±0,15***###	***	***	ns
	10	6,56±0,14	7,18±0,22*	6,45±0,17	6,93±0,20	ns	**	ns
	20	6,80±0,23	7,52±0,22*	7,20±0,21	7,30±0,18	ns	ns	ns
LVID;s [mm]	2	6,00±0,13	5,56±0,16	5,63±0,13#	4,58±0,15***###	***	*	ns
	10	3,50±0,17	4,67±0,24***	3,18±0,20	3,75±0,29##	**	***	ns
	20	3,84±0,20	4,85±0,22**	3,67±0,22	4,35±0,22	ns	***	ns

HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners, LV-linksventrikulär, LVMI-Linksventrikulärer Massenindex, LVID,d/s-Linksventrikuläre Innendurchmesser in Diastole/Systole. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); I-Interaktion. n=7-27; ns-nicht signifikant; */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

Systolische und diastolische kontraktile Funktion

Die kardiale Funktion wurde getrennt nach Systole und Diastole betrachtet. In Abbildung 11 ist zunächst der Verlauf der diastolischen Funktion gezeigt, da sie früher Einschränkungen aufweist als die systolische. Die TAC hatte von Beginn an einen starken Einfluss auf die kardiale Funktion von HCR und LCR. Das Verhältnis E/e' war in HCR und LCR bereits nach zwei Wochen TAC erhöht. Jedoch zeigten nur HCR eine Erhöhung des Verhältnisses E/A . Es wurde sowohl durch einen verstärkten passiven (E : HCR-C $885,9 \pm 41,2$ vs HCR-TAC $945,4 \pm 48,7$ mm/s) als auch einen verringerten aktiven Einstrom (A : HCR-C $444,91 \pm 50,29$ vs HCR-TAC $330,08 \pm 31,61$ mm/s) bedingt. Nach sechs und zehn Wochen glichen sich die Reaktionen von HCR und LCR auf TAC indem beide stark erhöhte E/A - und E/e' -Verhältnisse zeigten. Die diastolische Funktion der HCR blieb daraufhin unverändert bis zum Zeitpunkt 20 Wochen nach TAC. Tabelle 5 zeigt zusätzlich die einzelnen Messwerte der diastolischen Funktion aus denen zur vollständigen Charakterisierung die Verhältnisse E/A und E/e' ermittelt wurden. Während der passive (E) und aktive Einstrom (A) der Kontrolltiere über den gesamten Untersuchungszeitraum unverändert blieben, zeigten TAC-Tiere beider Phänotypen nach zehn Wochen eine Erhöhung von E und A . Der aktive Einstrom war bei TAC-Tieren nach 20 Wochen stark reduziert, was auf eine Beeinträchtigung der Vorhofkontraktion zurückzuführen ist. Die Ventrikelbewegung stieg bei Kontrolltieren bis zum Zeitpunkt 20 Wochen gleichmäßig an. TAC Tiere beider Phänotypen zeigten diesen Anstieg ebenfalls, er war jedoch nur bei LCR Tieren vergleichbar mit dem der Kontrolltiere. HCR-TAC wiesen im Vergleich zur Kontrolle bereits nach zwei Wochen stark reduzierte Werte für A' auf. Nach 20 Wochen war A' der HCR-TAC gegenüber LCR-TAC deutlich reduziert. Besonders der frühe Anstieg von E/A und die stärkere Einschränkung der Ventrikelbewegung bei HCR-TAC könnten mit dem schlechteren Überleben der HCR verbunden sein.

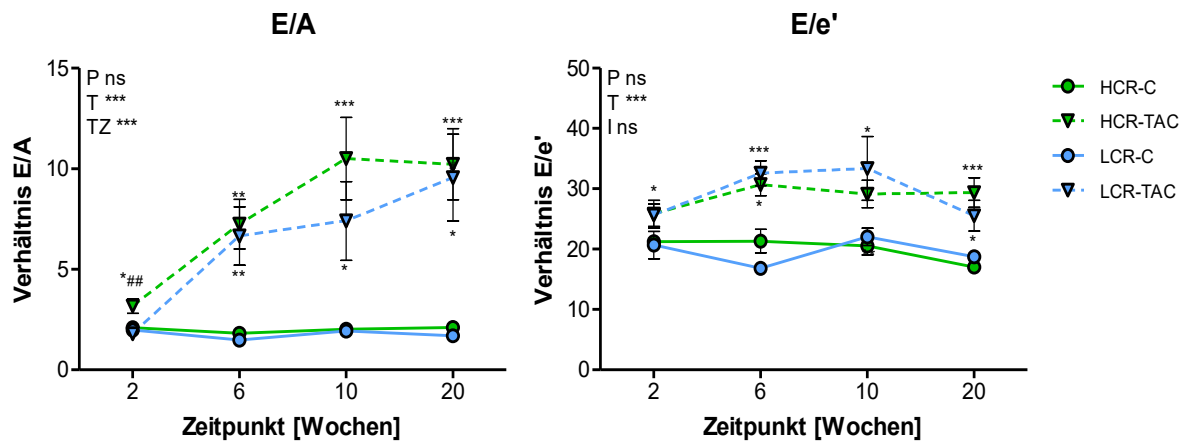


Abbildung 11 Diastolische Funktion: Verhältnisse aus passivem und aktivem Einstrom (E/A) und passivem Einstrom und Myokardbewegung (E/e') des linken Ventrikels von Stichproben nach zwei, sechs, zehn und zwanzig Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC). HCR-*High capacity runners*, LCR-*Low capacity runners*. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); I/TZ-Interaktion. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. n=7-27; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

Tabelle 5 Funktionelle Messwerte des linken Ventrikels der vier Versuchsgruppen während der Untersuchungszeitpunkte zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen

Parameter	Zeitpunkt [Wochen]	HCR Kontrolle		HCR TAC		LCR Kontrolle		LCR TAC		Statistik		
										P	T	I
E [mm/s]	2	893±33		926±43		825±42		883±39		ns	ns	ns
	10	868±22		1017±14*		832±28		967±66*		ns	***	ns
	20	889±43		974±46		806±51		972±68		ns	*	ns
A [mm/s]	2	446±43		343±32		449±51		487±40 ^{##}		ns	ns	ns
	10	475±32		240±56***		454±38		342±72		ns	*	*
	20	450±40		199±31***		517±50		229±49***		ns	***	ns
e' [mm/s]	2	44,6±2,6		39,0±2,0		42,8±4,1		34,3±1,9*		ns	*	ns
	10	46,3±2,7		37,3±2,1		39,8±2,3		41,4±6,0		ns	ns	*
	20	53,5±3,5		38,5±3,2**		47,6±3,7		43,3±4,7		ns	*	ns
A' [mm/s]	2	31,53±3,8		23,8±1,3 ^{**}		27,2±2,2		24,7±2,0		ns	*	ns
	10	44,3±3,5		27,0±2,7***		50,3±3,7		27,6±2,9***		ns	***	ns
	20	51,2±4,5		21,4±1,8***		45,1±3,4		31,5±3,4 ^{**#}		ns	***	*
E/DT [m/s²]	2	29,9±1,4		38,4±2,1*		28,4±2,6 [#]		29,6±2,1 ^{##}		*	ns	ns
	10	27,6±1,8		44,7±4,5***		27,3±1,9		45,9±4,7**		ns	***	ns
	20	31,4±1,8		71,6±12,3**		20,6±1,0		52,6±8,0*		ns	***	ns

HCR-*High capacity runners*, LCR-*Low capacity runners*, TAC-transverse Aortenkonstriktion, FS-Verkürzungsfraction, EF-Ejektionsfraction, E/A-passiver/aktiver Einstrom, e'/A'-Myokardbewegung während des passiven/aktiven Einstroms, E/DT-passiver Einstrom je Zeiteinheit. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. n=7-27; ns-nicht signifikant; */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

Abbildung 12 stellt den Verlauf der systolischen Funktion während der Drucküberlastung dar. Nach zwei Wochen TAC war bei LCR Tieren ein leichter Anstieg von EF und FS zu beobachten, der bei HCR ausblieb und zu einem Unterschied in der Reaktion auf TAC zwischen HCR und LCR führte. Sechs Wochen TAC führte bereits zu einer deutlichen Reduktion von EF und FS bei beiden Phänotypen. Zehn Wochen nach TAC waren EF und FS der HCR gegenüber LCR deutlich reduziert. Erst zwanzig Wochen nach TAC waren die Messwerte der systolischen Funktion auch bei LCR reduziert. LCR wiesen sowohl bei Kontroll- als auch bei TAC-Tieren eine höhere EF und FS auf als HCR. Neben geringeren Einschränkungen der diastolischen Funktion scheint auch die spätere Reduktion der systolischen Funktion mit dem Überlebensvorteil der LCR verbunden.

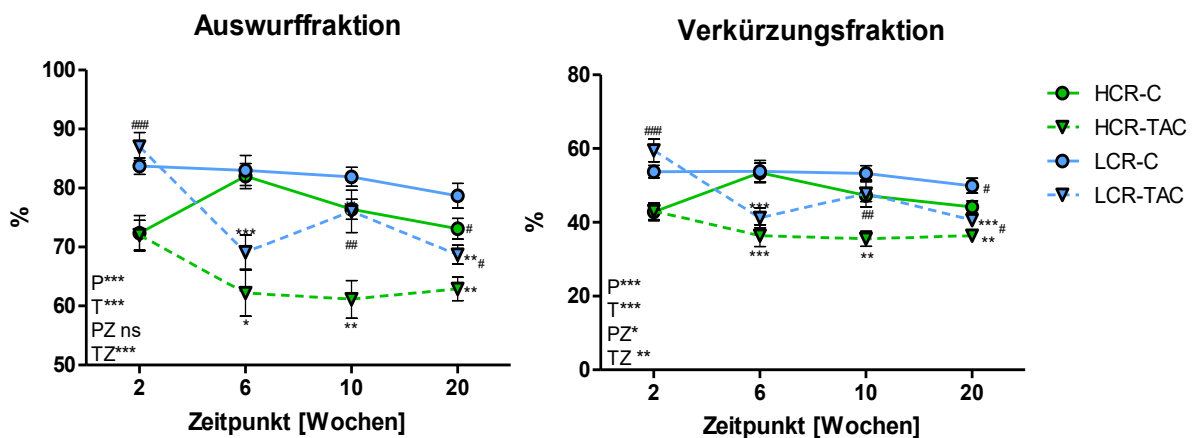


Abbildung 12 Systolische Funktion: Auswurf- und Verkürzungsfraction des linken Ventrikels von Stichproben nach zwei, sechs, zehn und zwanzig Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC). HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners, TAC-transverse Aortenkonstriktion. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); PZ/TZ-Interaktion. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. n=7-27; ns-nicht signifikant. */#p < 0,05; **/#p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.4 Morphometrie

In Abbildung 13 sind Körper- und Organgewichte sowie die Verhältnisse Herzgewicht/Körpergewicht und Lungengewicht/Körpergewicht dargestellt. Ausgehend von annähernd gleichem Körpergewicht zum Zeitpunkt der TAC nahmen LCR Tiere stärker zu als HCR. TAC-Tiere beider Phänotypen wiesen ein geringeres Körpergewicht auf, als ihre Kontrollen. Die zunehmende Erhöhung der Herz- und Lungengewichte beider Phänotypen wies auf eine pulmonale Kongestion hin. Das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht reduzierte sich während des Beobachtungszeitraumes, stieg jedoch bei HCR-TAC zum Zeitpunkt 20 Wochen

nach TAC wieder an. Das Lungen- zu Körpergewicht reduzierte sich in allen Gruppen bis 10 Wochen. Kontrollgruppen zeigten darauf keine weitere Veränderung dieses Verhältnisses. HCR-TAC wiesen nach 20 Wochen signifikant erhöhte Lungen- zu Körpergewichte und Herz- zu Körpergewichte im Vergleich zu den Kontrollen und zu LCR-TAC auf, was für eine stärkere Stauung bei Linksherzversagen spricht.

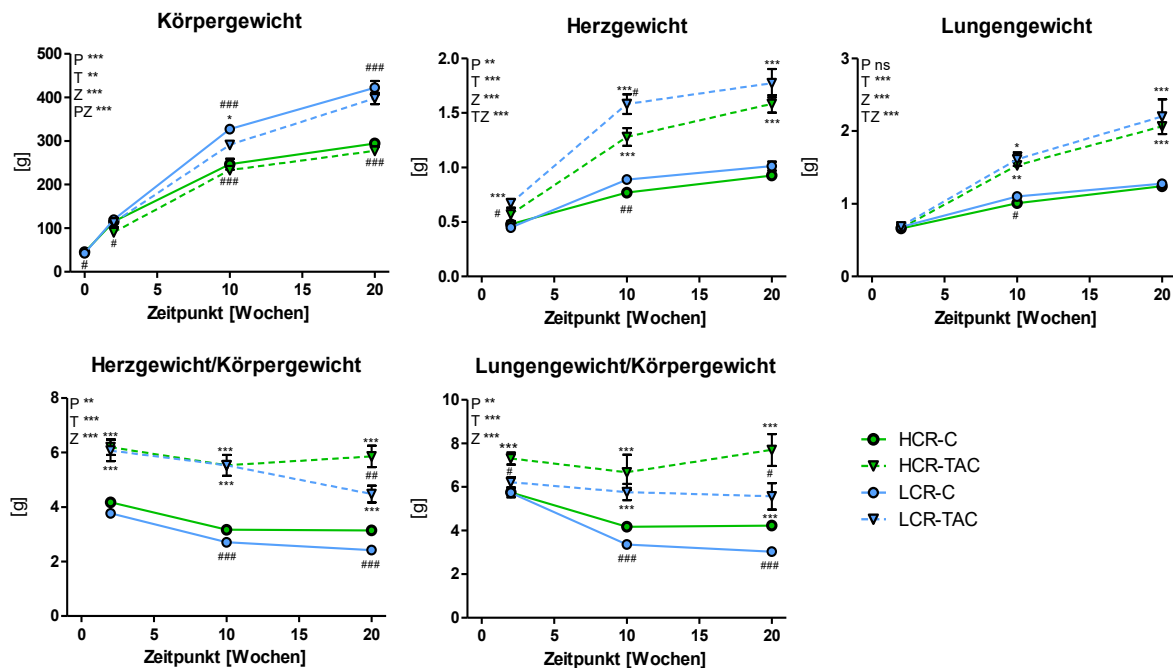


Abbildung 13 Entwicklung von Körper-, Herz- und Lungengewichten, sowie von Herz-/Körpergewicht (HG/KG) und Lungen-/Körpergewicht (LG/KG) Verhältnissen nach zwei, zehn und zwanzig Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC). HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); Z-Zeitpunkt, PZ/TZ-Interaktion. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. n=4-24; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/###p < 0,01; ***/###p < 0,001

Tabelle 6 fasst weitere Charakteristika der vier Versuchsgruppen zusammen. Das Alter der Tiere unterschied sich zum jeweiligen Messzeitpunkt nicht. TAC verzögerte das Wachstum der Tiere leicht, verdeutlicht durch leicht geringere Tibialängen nach zehn Wochen. Bei ausgewachsenen Tieren (20 Wochen) bestand dieser Unterschied nicht mehr. Im Gegensatz zu LCR wurden Muskel- und Fettgewichte bei HCR anfangs durch TAC reduziert. Das Lebergewicht der Phänotypen unterschied sich, wurde jedoch nicht durch eine TAC beeinflusst.

Tabelle 6 Alter, Tibiallänge und Organgewichte der vier Versuchsgruppen während der Untersuchungszeitpunkte zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen

Parameter	Zeitpunkt [Wochen]	HCR Kontrolle	HCR TAC	LCR Kontrolle	LCR TAC	Statistik		
						P	T	I
Alter [W]	2	5,21±0,17	5,17±0,15	5,53±0,14	5,37±0,14	ns	ns	ns
	10	13,3±0,2	13,2±0,2	13,7±0,3	13,8±0,3	ns	ns	ns
	20	24,3±0,3	24,2±0,4	23,5±0,4	24,4±0,3	ns	ns	ns
TL [mm]	2	25,4±0,2	23,4±0,5	25,6±0,4	24,5±0,8	ns	*	ns
	10	36,1±0,4	34,6±0,3**	38,1±0,3###	35,8±0,4***#	***	**	ns
	20	38,1±0,4	37,3±0,3	40,9±0,5###	40,6±0,4###	***	ns	ns
Ventrikel [g]	2	0,46±0,02	0,52±0,05	0,42±0,01	0,64±0,04***#	ns	***	*
	10	0,73±0,03	1,18±0,07***	0,90±0,05	1,38±0,09***#	**	***	ns
	20	0,88±0,02	1,41±0,06***	0,96±0,03	1,55±0,10***	ns	***	ns
HG/TL [mg/mm]	2	19,0±0,6	24,1±2,6**	17,7±0,6	27,1±1,0***	ns	***	ns
	10	21,4±0,6	36,7±2,6***	23,5±0,7###	45,6±2,7***#	***	***	***
	20	24,4±0,6	43,2±2,5***	25,3±0,7	47,3±3,6***	ns	***	ns
Leber [g]	2	5,68±0,09	4,54±0,20	4,74±0,37	4,86±0,34	ns	ns	ns
	10	8,38±0,33	8,62±0,39	10,0±0,7#	10,5±1,1#	***	ns	ns
	20	9,72±0,27	9,87±0,37	11,8±0,6###	12,1±0,4###	***	ns	ns
M. gas [g]	2	1,17±0,05	0,82±0,04*	1,17±0,05	1,10±0,10#	ns	*	ns
	10	3,04±0,16	2,80±0,09	3,28±0,16	3,26±0,09#	*	ns	ns
	20	3,72±0,09	3,38±0,12	4,57±0,19###	4,12±0,14***#	***	*	ns
M. sol. [g]	2	0,09±0,01	0,06±0,01*	0,09±0,00	0,10±0,01###	**	ns	*
	10	0,23±0,01	0,21±0,01	0,25±0,01#	0,23±0,01	**	*	ns
	20	0,31±0,01	0,26±0,01**	0,33±0,02	0,33±0,01###	***	ns	*
Fett [g]	2	0,32±0,02	0,16±0,05*	0,35±0,03	0,36±0,05##	*	ns	ns
	10	2,88±0,32	2,05±0,14*	4,27±0,33###	2,92±0,31***#	***	**	ns
	20	3,24±0,19	2,28±0,12	7,06±0,62###	6,21±0,57###	***	ns	ns

HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners, KG-Körpergewicht; HG-Herzgewicht, LG-Lungengewicht; TL-Tibiallänge. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. n=4-24; ns-nicht signifikant. */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.5 Glukosetoleranz

Abbildung 14 verdeutlicht die Glukosetoleranz von HCR und LCR nach zehn und zwanzig Wochen als zwei markante Zeitpunkte der Herzinsuffizienzentwicklung und entsprechender Kontrollen. Nach zehn Wochen wiesen LCR über alle Gruppen hinweg eine höhere Nüchternblutglukose auf als HCR. Dieser Unterschied wurde vorrangig durch die Kontrolltiere erzeugt. 10 Wochen TAC hatten keinen Einfluss auf die Glukosetoleranz von HCR und LCR.

Nach zwanzig Wochen TAC unterschieden sich HCR und LCR in ihrer basalen Blutglukose nicht. Drucküberlastung führte zu keinem Unterschied zwischen den Gruppen, senkte aber den basalen Blutzucker tendenziell bei HCR Tieren. LCR zeigten über alle Gruppen hinweg eine verminderte Glukosetoleranz, gekennzeichnet durch eine signifikant höhere AUC als HCR. Eine TAC führte zur leichten Reduktion der AUC ($p=0,09$) und damit gesteigerten Glukosetoleranz bei LCR während bei HCR keine Veränderung auftrat. TAC führte in diesem Modell somit nicht zu einer Reduktion der systemischen Glukosetoleranz.

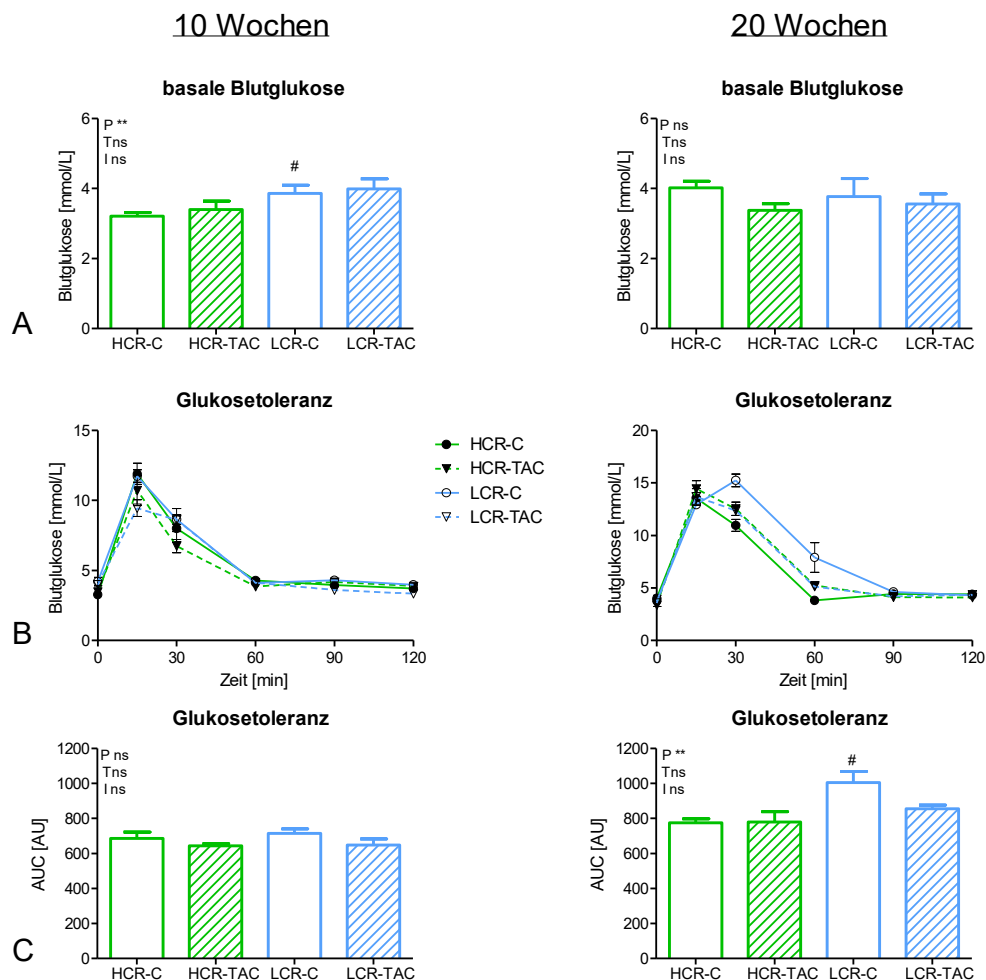


Abbildung 14 Messgrößen der Glukosetoleranz nach zehn und zwanzig Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. Nüchternblutglukose (A), Blutzuckerverlaufskurve während des Glukosetoleranztests (B) Fläche unter der Kurve (AUC) (C). HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp ($\#$), T-Behandlung ($*$). I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. $n=3-12$; ns-nicht signifikant; $*/\#p < 0,05$; $*/###p < 0,01$; $***/####p < 0,001$

3.6 Proteinanalytik

Aufgrund der unterschiedlichen systemischen Glukosetoleranz von HCR und LCR im Alter von 23 Wochen, wurden zu diesem Zeitpunkt auch spezifisch im Herzen die Proteinexpression und –phosphorylierung von IR, Akt und GLUT-4 der Insulinsignalkaskade untersucht. Abbildung 15 zeigt, dass die kardiale Expression von Insulinrezeptor und GLUT-4 Transporter weder durch den Phänotyp noch durch die TAC beeinflusst wurden. Die Untersuchung des Phosphorylierungsgrades zeigte eine signifikant reduzierte Aktivierung des Insulinrezeptors bei LCR. Die entsprechend höhere Gesamtexpression von Akt bei LCR scheint dies zu kompensieren, sodass das pAkt/Akt-Verhältnis zwischen HCR und LCR vergleichbar war. TAC hatte keinen Einfluss auf die insulinstimulierte Aktivierung von IR und Akt bei LCR, reduzierte sie jedoch bei HCR leicht. Die basalen Unterschiede in der kardialen Insulinempfindlichkeit wurden durch TAC somit aufgehoben.

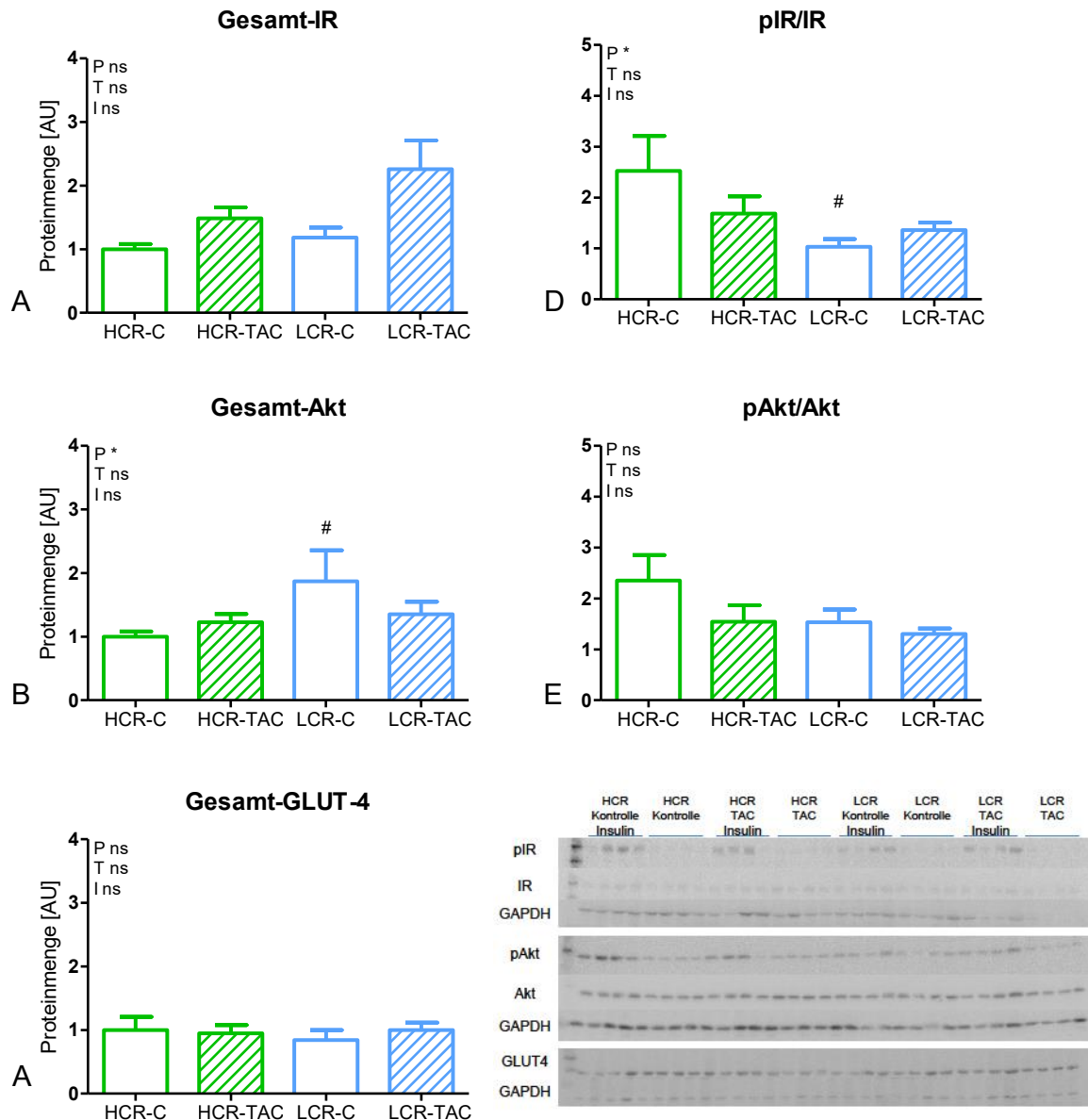


Abbildung 15 Kardiale Insulinempfindlichkeit nach zwanzig Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. Proteinexpression von Insulinrezeptor (A), Akt (B) und GLUT-4 (C) sowie Phosphorylierungsgrad von Insulinrezeptor (D) und Akt (E). HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. IR-Insulinrezeptor. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*). I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=4; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.7 Isolierte Mitochondrien

Im Folgenden sind zunächst die Morphologie, Proteingehalte und die Citratsynthaseaktivität isolierter Mitochondrien beschrieben.

3.7.1 Morphologie isolierter Mitochondrien

Eine zweiwöchige TAC veränderte die Morphologie der Mitochondrien nicht. Es ließen sich zu diesem Zeitpunkt auch keine Unterschiede zwischen den Mitochondrienpopulationen eines Gewebes erkennen. Abbildung 16 zeigt Größe und Komplexität isolierter Mitochondrien aus Herz- und Skelettmuskel, sowie Lebergewebe nach zehn Wochen TAC und entsprechender Kontrollen. Lebermitochondrien unterschieden sich weder durch den Phänotyp noch erfuhren sie durch eine TAC eine Veränderung. LCR wiesen deutlich komplexere kardiale Mitochondrien SS HCR ($12,88 \pm 0,92$ vs. LCR $16,43 \pm 0,70$; $p=0,006$) und größere Skelettmuskelmitochondrien auf als HCR (FS HCR $76,43$ vs. LCR $88,45$; $p=0,005$). TAC reduzierte bei LCR Größe und Komplexität der SSM von Herz und Skelettmuskel und steigerte sie in den Herz-IFM. Größe und Struktur der Mitochondrien der HCR waren bei TAC unverändert.

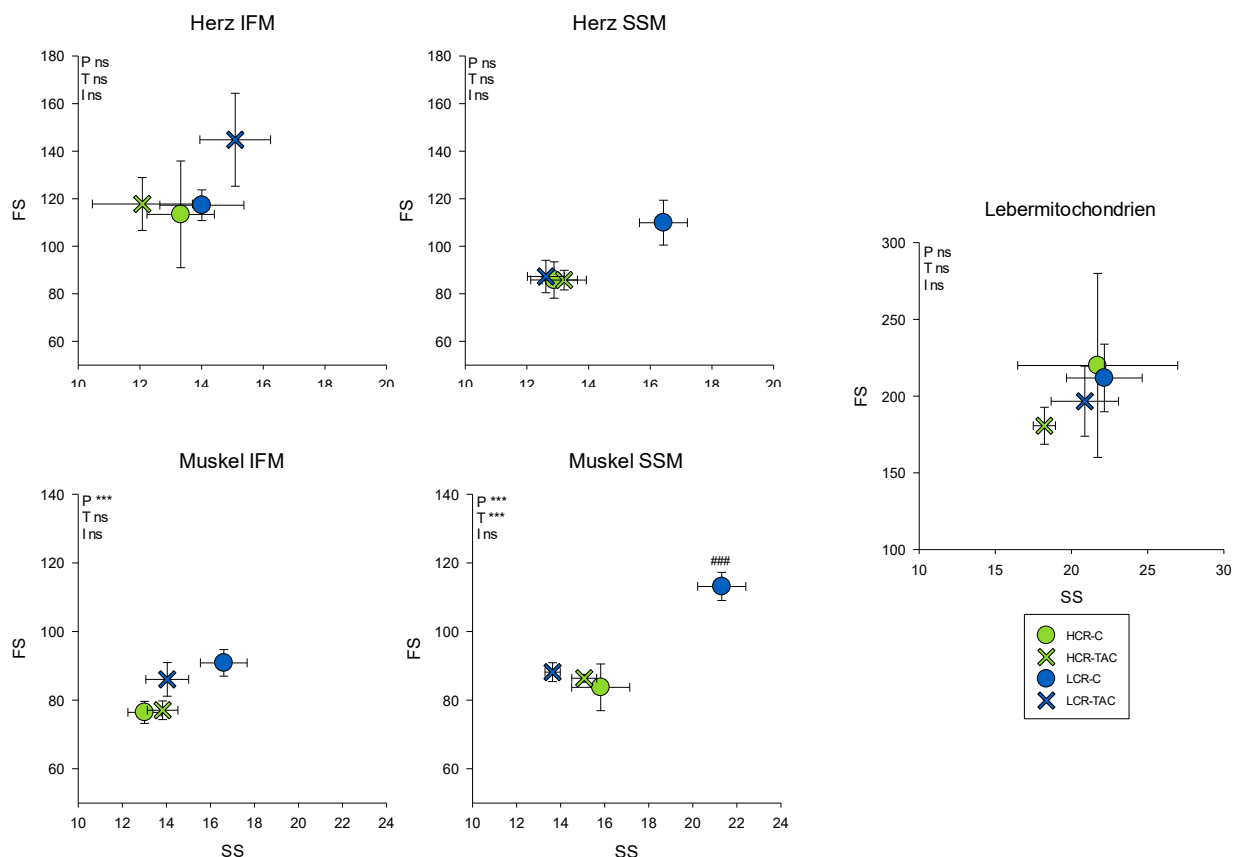


Abbildung 16 Größe und Komplexität der Mitochondrienpopulationen zehn Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC). Datenpaare aus Forward- (FS) und Sideward scatter (SS) der Herz-, Skelettmuskel- und Lebermitochondrien. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners, IFM-interfibrilläre-, SSM-subsarcolemmale Mitochondrien. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. n=4-7; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.7.2 Proteinkonzentration

In Tabelle 7 sind die Proteinkonzentrationen isolierter Mitochondrien sowie der Gewebehomogenate aus Herzmuskel, *M. gastrocnemius* und Leber dargestellt. Eine TAC führte zu einer tendenziellen Steigerung der Proteinmenge isolierter, kardialer Mitochondrien beider Phänotypen. Zum Zeitpunkt 20 Wochen nach TAC wiesen LCR im Vergleich zu HCR geringere Proteinmengen des Skelettmuskels auf.

Tabelle 7 Proteinmengen isolierter Mitochondrienpopulationen IFM/SSM und des Homogenats von Herz-, Skelettmuskel und Leber der vier Versuchsgruppen während der Untersuchungszeitpunkte zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen

Gewebe	Population	Zeitpunkt [Wochen]	HCR Kontrolle	HCR TAC	LCR Kontrolle	LCR TAC	Statistik		
							P	T	I
Herz	Hom	2	12,0±1,9	13,8±1,8	13,0±1,0	11,1±1,1	ns	ns	ns
		10	10,3±0,9	8,92±0,41	9,05±1,60	10,7±0,6	ns	ns	ns
		20	10,7±1,0	11,8±1,1	9,92±0,72	9,42±1,01	ns	ns	ns
	IFM	2	11,3±1,0	15,2±1,5	10,5±1,3	15,7±1,1	ns	*	ns
		10	10,7±1,0	14,1±1,6	12,2±1,6	16,9±2,0	ns	*	ns
		20	16,9±1,0	19,4±1,4	16,9±0,6	18,7±1,8	ns	ns	ns
	SSM	2	6,21±1,55	6,45±1,06	3,41±0,67	5,73±1,48	ns	ns	ns
		10	5,26±0,91	6,16±0,90	5,28±1,04	6,13±1,30	ns	ns	ns
		20	6,75±0,93	8,65±0,92	6,61±0,76	6,43±0,44	ns	ns	ns
<i>M. gastrocnemius</i>	Hom	2	12,6±2,0	9,21±0,71	10,9±1,3	9,61±1,07	ns	ns	ns
		10	7,89±0,79	7,63±0,58	6,41±1,23	9,54±1,16	ns	ns	ns
		20	9,14±0,74	9,49±0,77	8,07±0,68	8,14±0,60	ns	ns	ns
	IFM	2	8,78±0,52	13,0±1,2	9,25±0,96	11,1±1,8	ns	ns	ns
		10	8,04±1,37	8,42±1,69	8,98±1,16	9,39±1,78	ns	ns	ns
		20	16,3±1,2	16,3±1,6	10,7±0,9 ^{###}	10,2±0,9 ^{##}	***	ns	ns
	SSM	2	6,78±2,03	4,48±1,28	3,65±0,62	3,81±0,81	ns	ns	ns
		10	8,66±1,58	5,75±0,89	4,10±1,08 ^{##}	3,95±0,68	**	ns	ns
		20	6,24±0,84	6,03±0,88	3,23±0,37 ^{###}	2,93±0,29 ^{##}	***	ns	ns
Leber	Hom	2	18,1±2,4	14,8±0,6	18,0±2,2	13,6±1,0	ns	ns	ns
		10	14,6±0,8	14±1,3	12,4±2,1	15,0±0,3	ns	ns	ns
		20	14,9±1,0	10,1±1,6	15,2±1,0 [#]	13,3±0,5	ns	ns	ns
	Mito	2	20,0±1,4	30,6±2,5	29,4±3,1	28,6±3,4	ns	ns	ns
		10	29,6±2,7	30,1±2,3	31,4±1,9	33,8±2,8	ns	ns	ns
		20	40,7±1,3	42,2±3,4	33,9±2,5 ^{###}	28,8±2,5	***	ns	ns

HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners, Hom-Homogenat, IFM-interfibrilläre Mitochondrien, SSM-subsarkolemmale Mitochondrien. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler [mg/ml] angegeben. n=5-10; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.7.3 Citratsynthaseaktivität

Abbildung 17 zeigt die Citratsynthaseaktivitäten von Herz-, Skelettmuskel- und Leberhomogenaten. Die Enzymaktivität fiel im Verlauf von zwei zu 20 Wochen ab. TAC hatte zu keiner Zeit Einfluss auf die Citratsynthaseaktivitäten der Gewebe, was für einen unveränderten mitochondrialen Gehalt der Gewebe spricht.

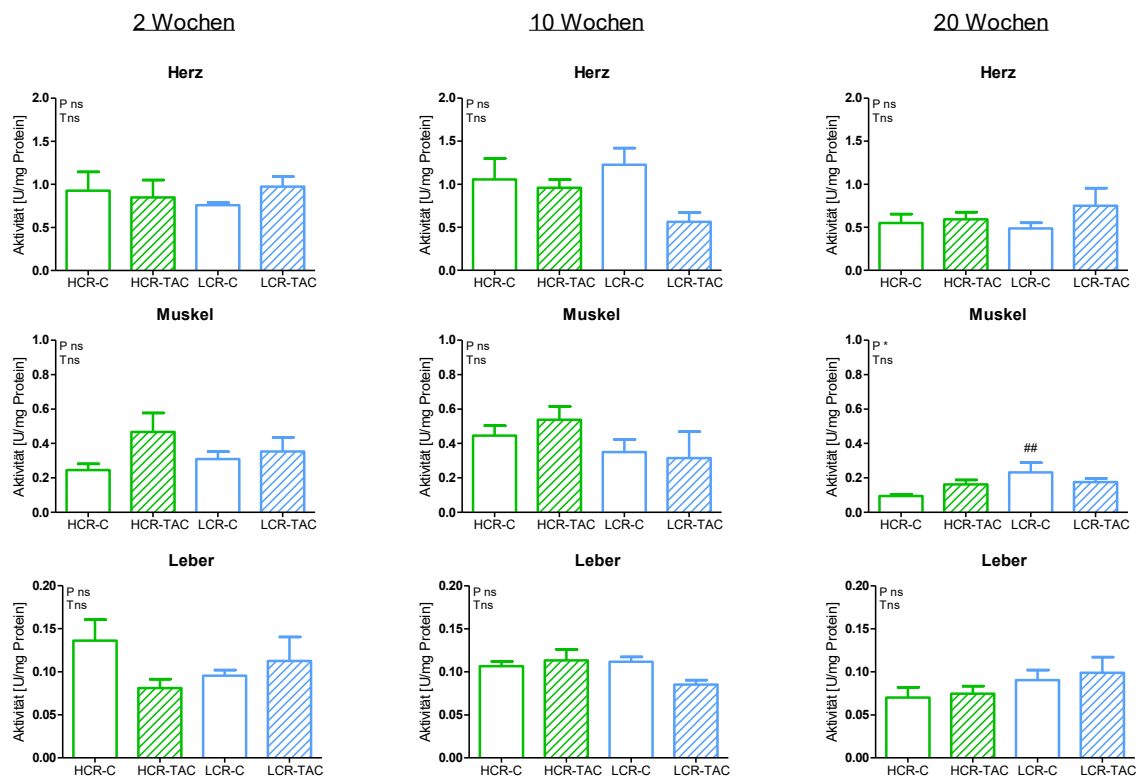


Abbildung 17 Citratsynthaseaktivität der Gewebekomponenten nach zwei (A), zehn (B) und zwanzig (C) Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*). I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=5-10; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

Auch in isolierten Mitochondrien hatte TAC keinen Einfluss auf die Citratsynthaseaktivität, wie in Tabelle 15 im Anhang dargestellt ist. Kardiale IFM und SSM der HCR wiesen leicht höhere Enzymaktivitäten auf als die der LCR.

3.8 Funktion/ respiratorische Kapazität isolierter Mitochondrien

3.8.1 *M. gastrocnemius*-Mitochondrien

Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die respiratorische Kapazität isolierter Mitochondrien des *M. gastrocnemius*. Bereits im Alter von fünf Wochen wiesen LCR

mit allen Substraten eine geringere maximale Respiration auf als HCR. Dieser Unterschied wird besonders in den IFM deutlich. Die deutlich unterschiedliche respiratorische Kapazität des Skelettmuskels verdeutlicht die Charakteristik des Phänotyps HCR und LCR. Eine hohe Ausdauerkapazität war dabei auch mit einer hohen respiratorischen Kapazität des Skelettmuskels verbunden.

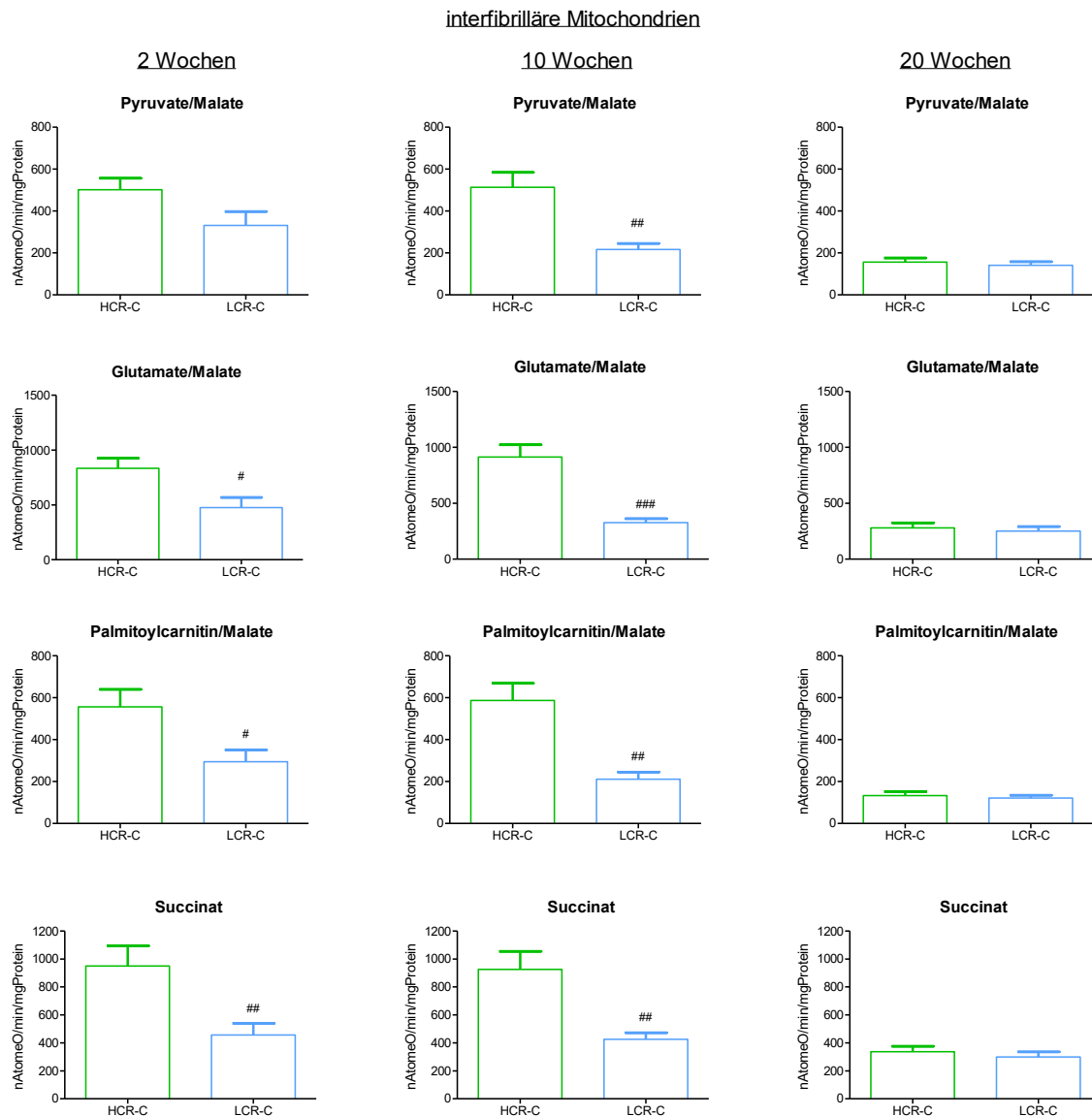


Abbildung 18 Respiratorische Kapazität interfibrillärer Mitochondrien des *M. gastrocnemius* von Kontrolltieren. Maximale Respiration von IFM im Alter von 5, 13 und 23 Wochen. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#). Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=5-10; ns-nicht signifikant, #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001

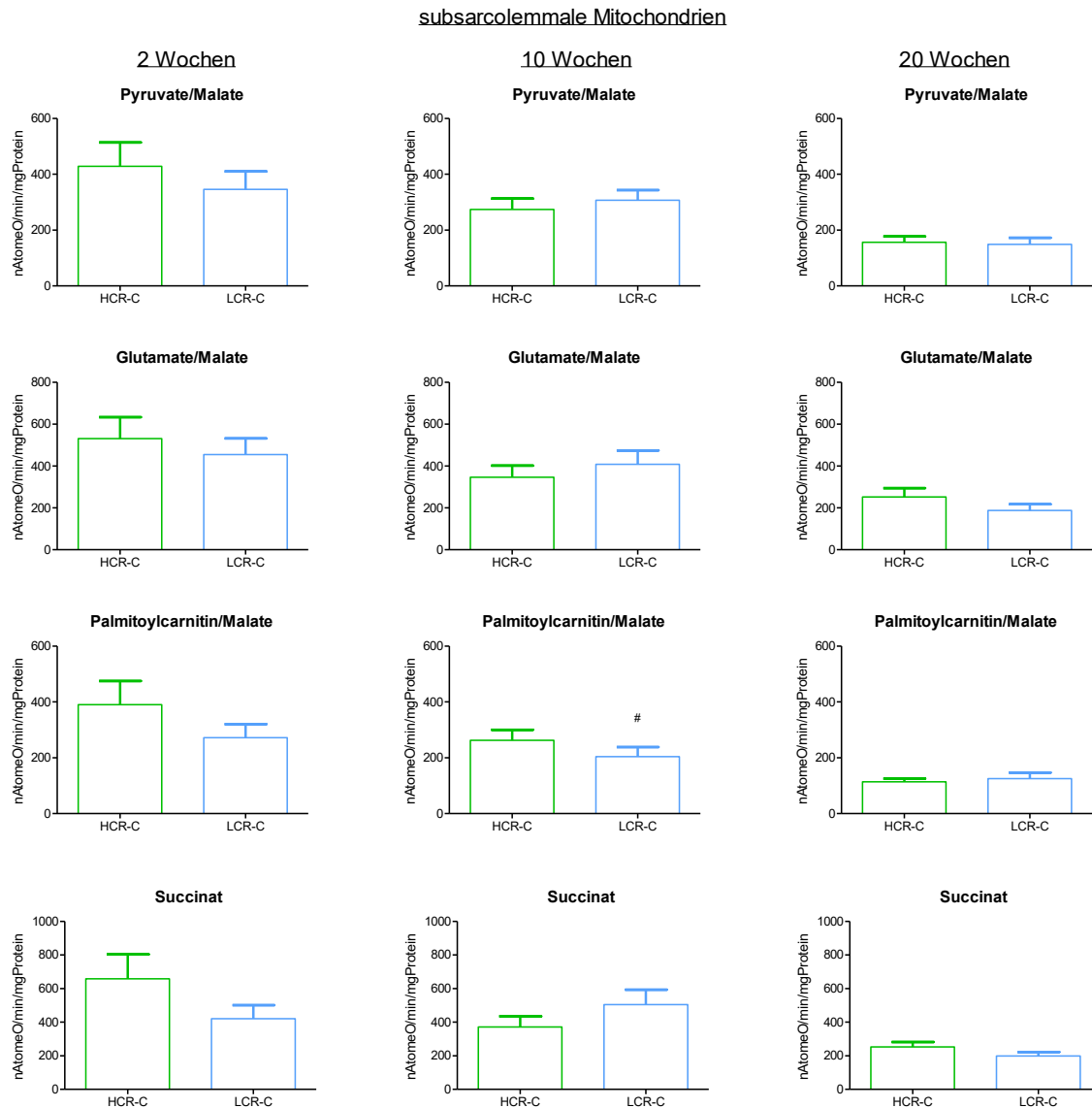


Abbildung 19 Respiratorische Kapazität subsarcolemmaler Mitochondrien des *M. gastrocnemius* von Kontrolltieren. Maximale Respiration von SSM im Alter von 5, 13 und 23 Wochen. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#). Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=5-10; ns-nicht signifikant, #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001

Zusätzlich zum Herzen wurde auch im *M. gastrocnemius* die respiratorische Kapazität der Mitochondrien während der kardialen Drucküberlastung gemessen. Abbildung 28 und Abbildung 29 im Anhang verdeutlichen, dass die TAC keinen Einfluss auf die maximale Respiration isolierter IFM und SSM des Skelettmuskels hatte. Tabelle 16 im Anhang zeigt, dass auch unter Verwendung der Substrate PCoA, DHQ und TMPD eine TAC keinen Einfluss auf die respiratorische Kapazität der Mitochondrien hatte. Unterschiede zwischen den beiden Phänotypen wurden jedoch auch dabei deutlich.

3.8.2 Herzmitochondrien

Kardiale SSM wiesen meist eine geringere Aktivität auf als IFM. Zwei Wochen TAC hatten keinen einheitlichen Einfluss auf die kardiale mitochondriale Respiration. Die ADP-stimulierte Respiration der LCR wurde in den IFM durch TAC mit allen Substraten tendenziell gesteigert, während sie bei HCR unverändert blieb. Die ADP-stimulierte Respiration mit Py/Mal war auch nach zehn Wochen TAC in beiden Mitochondrienpopulationen der LCR signifikant erhöht. Weitere Substrate spiegelten diesen Effekt nicht wider. HCR wiesen hier mit fast allen Substraten eine höhere ADP-stimulierte Respiration auf als LCR, zeigten aber keine Veränderung durch TAC. Zwanzig Wochen TAC hatte keinen Einfluss auf die maximale respiratorische Kapazität der Mitochondrien. Zwischen beiden Phänotypen bestand kaum Unterschied. Die IFM zeigten jedoch weiterhin eine allgemein höhere maximale Respiration als die SSM. Die phänotypischen Unterschiede in der mitochondrialen Respiration sind im Herzen weniger deutlich ausgeprägt als im Skelettmuskel. LCR zeigten eine frühzeitige Anpassung an die TAC, die bei HCR ausblieb oder verzögert auftrat.

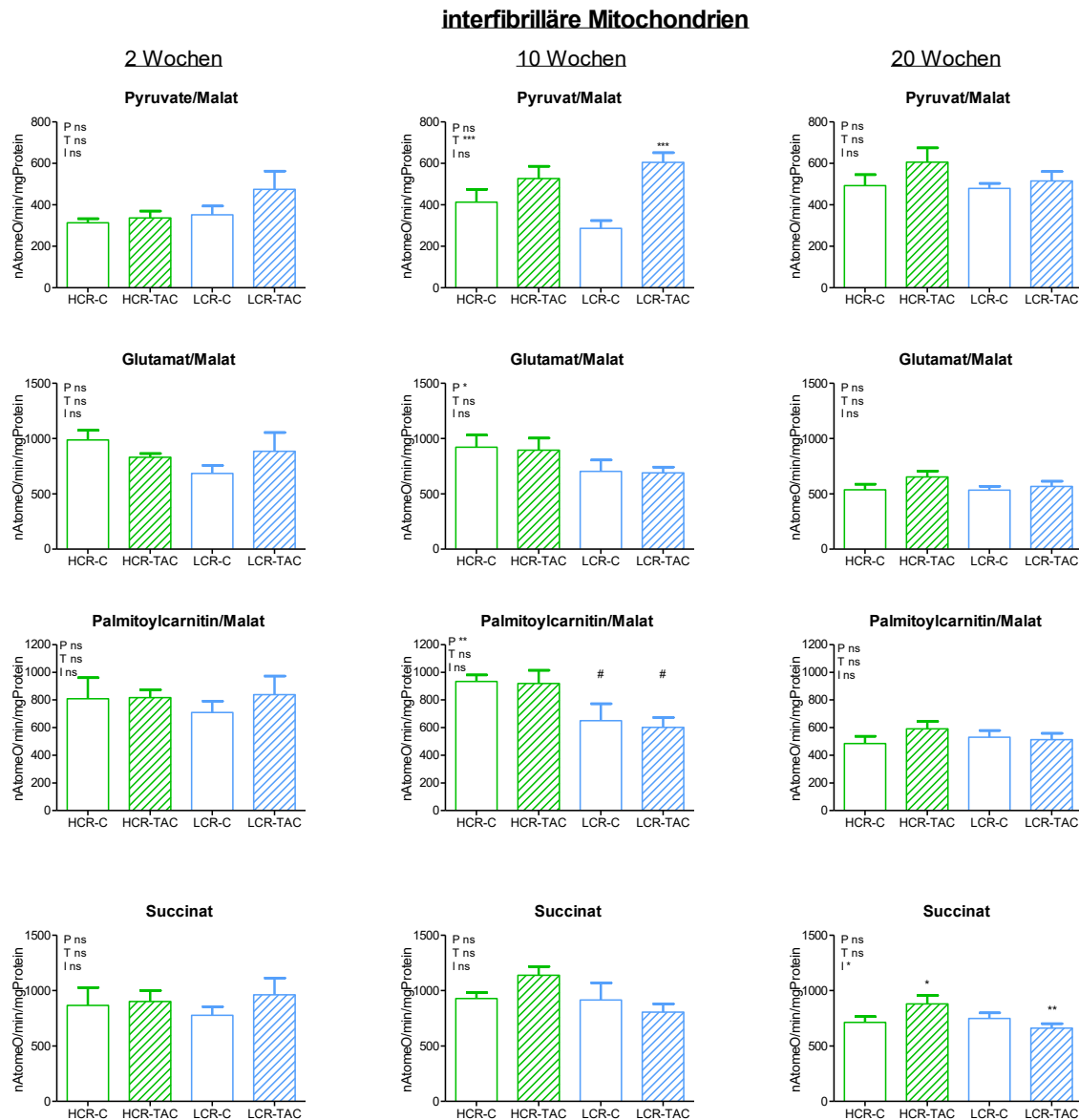


Abbildung 20 Respiratorische Kapazität kardialer interfibrillärer Mitochondrien. Maximale Respiration von IFM zu den Zeitpunkten zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=5-10; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

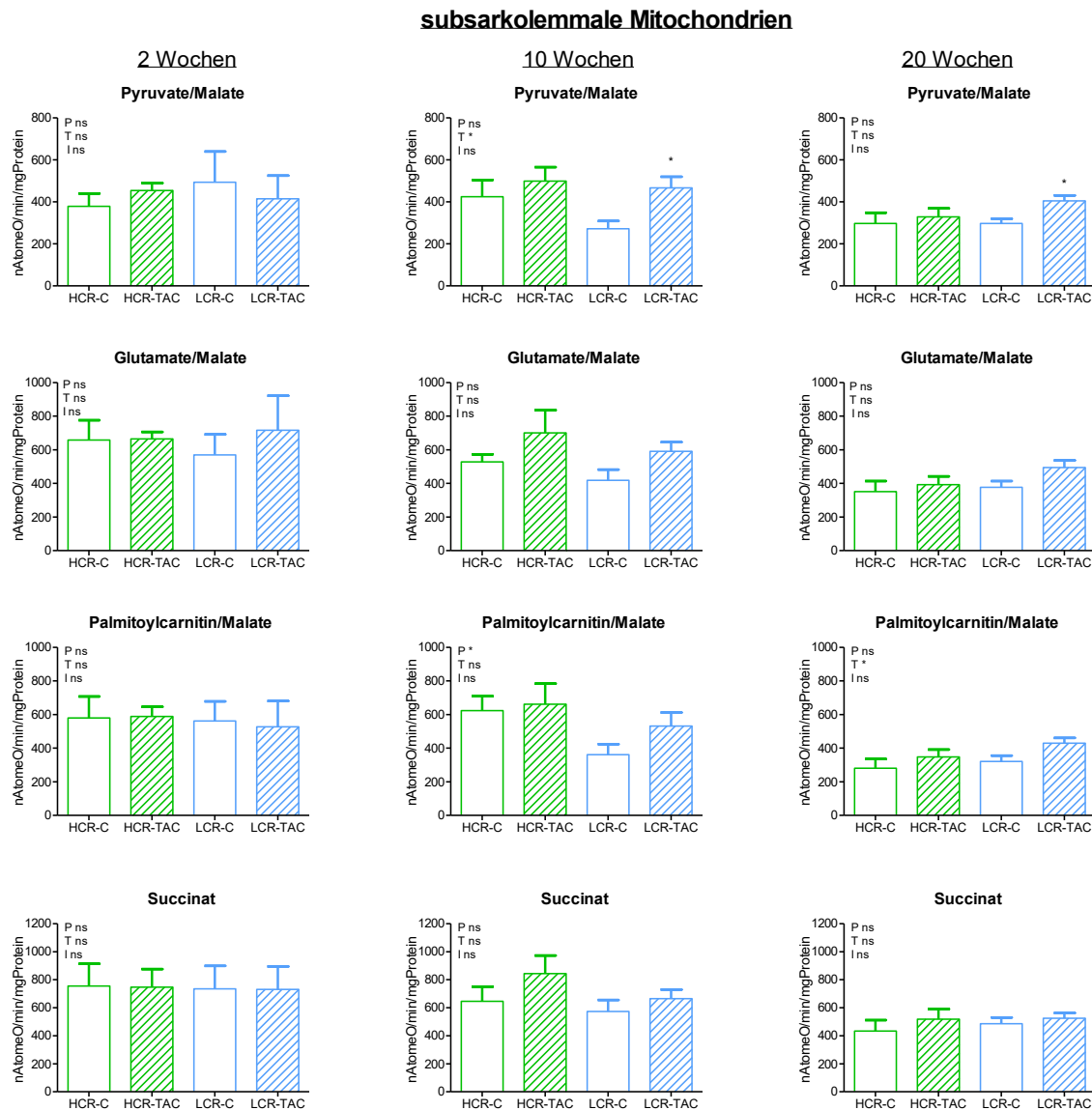


Abbildung 21 Respiratorische Kapazität kardialer subsarkolemmaler Mitochondrien. Maximale Respiration von SSM zu den Zeitpunkten zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. HCR-*High capacity runners*, LCR-*Low capacity runners*. P-Phänotyp (#), T-Behandlung, I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=5-10; ns-nicht signifikant, #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001

Tabelle 8 zeigt die respiratorische Kapazität kardialer Mitochondrien unter Verwendung der Substrate PCoA, DHQ und TMPD. TAC hatte dabei keinen Einfluss auf respiratorische Kapazität mit diesen Substraten.

Tabelle 8 Respiratorische Kapazität kardialer Mitochondrien. Maximale Respiration von IFM und SSM zu den Zeitpunkten zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen.

Substrat		Wochen nach TAC	HCR-C	HCR-TAC	LCR-C	LCR-TAC	Statistik		
							P	T	I
Herz IFM	PCoA/ Ma	2	559±140	369±53	339±43 [#]	490±59	ns	ns	ns
		10	592±49	754±20	474±83	552±68 [#]	*	ns	ns
		20	501±53	619±57	521±37	553±52 [#]	*	ns	ns
	DHQ	2	1752±188	1259±205	1299±174	1570±201	ns	ns	ns
		10	1366±144	1611±83	1331±250	1206±105	ns	ns	ns
		20	1229±88	1378±166	1565±57	837±85	ns	ns	ns
	TMPD	2	2363±313	1992±192	1817±195	2255±379	ns	ns	ns
		10	1960±90	2350±171	2086±278	2083±251	ns	ns	ns
		20	1924±129	2272±285	2347±170	1453±108	ns	ns	ns
Herz SSM	PCoA/ Ma	2	476±119	454±44,4	390±79	404±86	ns	ns	ns
		10	499±94	587±79	321±55	484±52	ns	ns	ns
		20	313±50	387±48	315±34	437±12	ns	ns	ns
	DHQ	2	1375±223	1595±262	1710±309	1305±349	ns	ns	ns
		10	1072±193	1285±172	948±115	1168±124	ns	ns	ns
		20	835±145	1008±127	975±82	827±58	ns	ns	ns
	TMPD	2	1793±403	1728±249	1764±398	1661±370	ns	ns	ns
		10	1329±302	1416±192	1274±175	1698±173	ns	ns	ns
		20	914±174	1727±243	1478±131	1240±128	ns	ns	ns

Werte sind als Mittelwert±Standardfehler [nAtomeO/min/mg] angegeben. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. n=5-10; ns-nicht signifikant, #p < 0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001

3.8.3 Lebermitochondrien

Tabelle 9 zeigt die maximale Respiration der Lebermitochondrien nach zwei, zehn und zwanzig Wochen TAC und entsprechender Kontrollgruppen. HCR zeigten nach zwei und zehn Wochen eine höhere Respiration als LCR, unabhängig vom genutzten Substrat. Bei HCR-TAC Tieren reduzierte sich die maximale Respiration zwischen zehn und zwanzig Wochen, während sie bei LCR-TAC Tieren leicht anstieg. Die TAC hatte insgesamt kaum Einfluss auf die respiratorische Kapazität isolierter Lebermitochondrien. Dies deutet, auch in Verbindung mit den unveränderten Lebergewichten darauf hin, dass die TAC die Leber nicht stark beeinträchtigt hat.

Tabelle 9 Maximale Respiration der Lebermitochondrien nach zwei, zehn und zwanzig Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen

Substrat	Zeitpunkt [Wochen]	HCR Kontrolle	HCR TAC	LCR Kontrolle	LCR TAC	Statistik		
						P	T	I
Glutamat/ Malat	2	225±34	241±11	184±18	215±34	ns	ns	ns
	10	263±18	255±56	157±16 [#]	174±14	**	ns	ns
	20	152±14	155±14	155±12	198±16 ^{*#}	ns	ns	ns
Pyruvat/ Malat	2	67,4±8	75,3±10	45,1±5 [#]	62,0±7	*	ns	ns
	10	93,7±7,0	76,4±10	42,0±5,0 ^{###}	58,1±7,0	***	ns	*
	20	65,7±5,4	60,3±5,8	55,6±5,0	67,3±5,0*	ns	ns	*
Succinat	2	314±43	342±4	266±29	316±44	ns	ns	ns
	10	286±13	270±38	201±14 [#]	196±16	**	ns	ns
	20	176±19	200±22	220±15	208±26	ns	ns	ns
PC/Malat	2	174±24	192±8	156±16	213±24	ns	ns	ns
	10	208±26	200±32	111±18 ^{##}	139±12	**	ns	ns
	20	142±19	144±13	118±12	137±13	ns	ns	ns
PCoA/ Malat	2	142±41	113±19	55,9±4,8 ^{##}	64,4±5,3	***	ns	ns
	10	148±21	174±28	101±16	117±11	*	ns	ns
	20	105±14	130±14	100±10	141±13 ^{**}	ns	**	ns
DHQ	2	317±42	345±8	287±19	361±40	ns	ns	ns
	10	317±36	288±43	214±24 [#]	195±27	*	ns	ns
	20	172±18	221±26	227±20	203±24	ns	ns	ns
TMPD	2	635±83	637±47	539±71	600±82	ns	ns	ns
	10	570±55	495±53	364±43 ^{##}	471±40	*	ns	ns
	20	394±39	525±63	507±42	441±73	ns	ns	ns

Werte sind als Mittelwert±Standardfehler [nAtomeO/min/mg] angegeben. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. PC-Palmitoylcarnitin; PCoA-PalmitoylCoA+Carnitin, P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); I-Interaktion. n=5-10; ns-nicht signifikant; */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.8.4 ADP-limitierte Respiration

Die IFM von Kontroll-LCR zeigten gegenüber Kontroll-HCR eine signifikant geringere ADP-limitierte Respiration, sowohl im Herzmuskel (PC: HCR 250,1±34,3 vs. LCR 149,3±19,8 und Glu/Ma: HCR 232,4±20,7 vs. LCR 144,9±19,28 nAtomeO/min/mg) als auch im *M. gastrocnemius* (PC: HCR 156,8±26,6 vs. LCR 75,3±14,0 und Glu/Ma HCR 166,3±25,7 vs. LCR 88,7±16,5 nAtomeO/min/mg). Auch Mitochondrien der Leber zeigten diesen Unterschied (Glu/Mal: HCR 52,7±8,2 vs. 30,4±3,7 nAtomeO/min/mg). Kontrolltiere unterschieden sich nach zehn Wochen, unter Ausnahme des Substrats Py/Mal (HCR 249,6±19,7 vs. LCR 172,7±24,3), und zwanzig Wochen in der ADP-limitierte Respiration des Herzens nicht.

Eine zweiwöchige TAC hatte keinen Einfluss auf die ADP-limitierte Atmung des Herzens oder des Skelettmuskels. Sie wurde jedoch in Lebermitochondrien der LCR mit allen Substraten erhöht (Bsp. Py/Mal LCR $23,8 \pm 3,0$ vs. LCR-TAC $36,8 \pm 4,1$ nAtomeO/min/mg). Zehn Wochen TAC beeinflussten die kardiale ADP-limitierte Atmung der HCR nicht und führten ausschließlich mit dem Substrat Py/Mal zur erhöhten ADP-limitierten Atmung in den SSM der LCR (LCR $185,6 \pm 18,6$ vs. LCR-TAC $270,6 \pm 21,7$ nAtomeO/min/mg). Die SSM des *M. gastrocnemius* zeigten bei LCR-TAC eine gegenüber den Kontrolltieren verringerte ADP-limitierte Respiration (LCR vs LCR-TAC: Py/Mal $198,6 \pm 29,4$ vs. $118,4 \pm 18,7$; Glu/Mal $256,0 \pm 41,1$ vs. $142,0 \pm 23,6$; Succ $301,9 \pm 46,6$ vs. $166,5 \pm 24,4$). LCR wiesen eine geringere ADP-limitierte Respiration auf als HCR (Py/Mal: HCR $183,6 \pm 18,4$ vs. LCR $88,4 \pm 19,6$ und PCoA/Mal: HCR $201,9 \pm 23,4$ vs. LCR $100,7 \pm 29,1$ nAtomeO/min/mg). Lebermitochondrien der Kontroll-LCR zeigten mit allen Substraten, ausgenommen DHQ, eine geringere ADP-limitierte Respiration als die der HCR (Bsp. Py/Mal: HCR $56,84 \pm 3,34$ vs. LCR $27,83 \pm 2,95$ n AtomeO/min/mg). TAC hatte keinen Einfluss auf die ADP-limitierte Respiration der Lebermitochondrien. TAC hatte nach 20 Wochen keinen Einfluss auf die Mitochondrien von HCR. TAC reduzierte zu diesem Zeitpunkt die ADP-limitierte Respiration bei kardialen IFM und SSM der LCR mit dem Substrat DHQ (IFM: LCR $872,1 \pm 139,0$ vs. LCR-TAC $326,3 \pm 42,7$ und SSM: LCR $590,6 \pm 43,6$ vs. LCR-TAC $381,0 \pm 52,2$ nAtomeO/min/mg). Die ADP-limitierte Respiration der Lebermitochondrien zeigte nach 20 Wochen keinen Einfluss durch TAC.

LCR wiesen häufig eine geringere ADP-limitierte Respiration auf als HCR. Die weitere Reduktion durch TAC deutet auf einen stabil aufrechterhaltenen Protonengradienten der LCR hin.

3.8.5 ADP/O

ADP/O gibt das Verhältnis zwischen phosphorylierten ADP-Molekülen je verbrauchtem Sauerstoffatom wider und stellt somit ein Maß für die Effizienz des Mitochondrium dar. Tabelle 10 zeigt das ADP/O-Verhältnis kardialer IFM und SSM. Nach zwei und zehn Wochen beeinflussen weder der Phänotyp noch die TAC den ADP/O. Erst nach 20 Wochen zeigte sich mit einzelnen Substraten eine Erhöhung des ADP/O bei LCR. TAC steigerte den ADP/O und damit die Effizienz der mitochondrialen Respiration bei HCR und LCR gleichermaßen.

Tabelle 10 Phosphorylierungseffizienz kardialer Mitochondrien ADP/O-Verhältnis nach zwei, zehn und zwanzig Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen

Parameter	Wochen nach TAC	HCR-C	HCR-TAC	LCR-C	LCR-TAC	Statistik				
						P	T	I		
Herz IFM	PC/Ma	2	1,28±0,14	1,21±0,11	1,24±0,07	1,22±0,10	ns	ns	ns	
		10	1,21±0,13	1,36±0,08	1,55±0,21	1,44±0,07	ns	ns	ns	
		20	0,96±0,07	1,00±0,08	1,04±0,06	1,40±0,18 [#]	*	ns	ns	
	Py/Ma	2	1,11±0,07	1,11±0,11	1,33±0,07	1,19±0,05	ns	ns	ns	
		10	1,04±0,15	1,34±0,10	1,26±0,09	1,39±0,08	ns	ns	ns	
		20	0,91±0,10	1,24±0,05 ^{**}	1,22±0,08 [#]	1,40±0,10	**	**	*	
	Succ	2	0,73±0,10	0,70±0,06	0,63±0,03	0,68±0,05	ns	ns	ns	
		10	0,83±0,04	0,78±0,07	0,78±0,08	0,81±0,08	ns	ns	ns	
		20	0,45±0,06	0,59±0,03 [*]	0,58±0,04 [#]	0,73±0,05 [#]	**	**	**	
	PCoA/ Ma	2	1,20±0,07	1,34±0,17	1,4±0,07	1,38±0,12	ns	ns	ns	
		10	1,24±0,11	1,32±0,04	1,63±0,21 [#]	1,51±0,06	*	ns	ns	
		20	1,04±0,08	1,20±0,05	1,23±0,06	1,35±0,10	*	ns	ns	
	Glu/Ma	2	1,10±0,08	1,20±0,08	1,24±0,05	1,00±0,15	ns	ns	ns	
		10	1,21±0,13	1,32±0,07	1,29±0,08	1,43±0,11	ns	ns	ns	
		20	0,89±0,07	1,26±0,08 [*]	1,09±0,11	1,37±0,18	ns	*	ns	
	DHQ	2	0,66±0,02	0,62±0,06	0,66±0,04	0,59±0,05	ns	ns	ns	
		10	0,89±0,08	0,78±0,07	0,68±0,06	0,76±0,07	ns	ns	ns	
		20	0,31±0,05	0,39±0,03	0,39±0,05	0,79±0,09 ^{**##}	***	***	*	
	Herz SSM	PC/Ma	2	1,06±0,13	1,20±0,13	1,05±0,24	1,11±0,16	ns	ns	ns
			10	0,97±0,11	1,07±0,10	1,23±0,20	1,20±0,09	ns	ns	ns
			20	0,60±0,09	1,00±0,08 [*]	0,88±0,06	1,11±0,19	*	ns	ns
		Py/Ma	2	0,87±0,07	0,99±0,10	0,87±0,14	1,01±0,12	ns	ns	ns
			10	0,83±0,10	1,03±0,12	1,05±0,06	1,13±0,08	ns	ns	ns
			20	0,64±0,10	1,05±0,06 ^{**}	1,03±0,07 [#]	1,29±0,13	**	**	ns
Succ		2	0,53±0,01	0,71±0,17	0,55±0,14	0,58±0,09	ns	ns	ns	
		10	0,74±0,11	0,66±0,08	0,53±0,03	0,73±0,06	ns	ns	ns	
		20	0,46±0,07	0,59±0,02	0,58±0,04	0,79±0,10 [#]	*	*	ns	
PCoA/ Ma		2	1,06±0,13	0,99±0,21	1,08±0,27	1,11±0,21	ns	ns	ns	
		10	1,05±0,09	1,14±0,08	1,12±0,19	1,26±0,08	ns	ns	ns	
		20	0,68±0,09	1,07±0,06 [*]	1,02±0,07 [#]	1,02±0,15	ns	ns	ns	
Glu/Ma		2	0,91±0,07	0,99±0,12	1,03±0,21	1,01±0,13	ns	ns	ns	
		10	0,92±0,08	0,94±0,10	0,83±0,03	1,15±0,10 ^{**}	ns	*	ns	
		20	0,47±0,09	0,97±0,08 ^{**}	0,82±0,05 [#]	1,34±0,20 ^{**##}	**	***	ns	
DHQ		2	0,53±0,02	0,51±0,07	0,42±0,08	0,47±0,08	ns	ns	ns	
		10	0,64±0,06	0,56±0,03	0,46±0,02 [#]	0,67±0,06 ^{**}	ns	ns	**	
		20	0,36±0,07	0,39±0,03	0,40±0,04	0,69±0,10 ^{**##}	*	*	ns	

IFM-interfibrilläre Mitochondrien, SSM-subsarkolemmale Mitochondrien, HCR-*High capacity runners*, LCR-*Low capacity runners*. PC-Palmitoylcarnitin, Py/Ma-Pyruvat/Malat, Succ-Succinat, PCoA-PalmitoylCoA+Carnitin, Glu/Ma-Glutamat/Malat; P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. n=5-10; ns-nicht signifikant; */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.8.6 Die Substrate PC und PCoA und die Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase

Abbildung 22 zeigt den Vergleich der maximalen respiratorischen Kapazität unter Nutzung von Palmitoylcarnitin (PC) oder Palmitoyl-CoA und Carnitin (PCoA) in IFM und SSM. Im Gegensatz zu PC ist die Aufnahme von PCoA ins Mitochondrium vom Membrantransporter CPT abhängig. HCR wiesen nach 10 Wochen mit PCoA eine im Vergleich zu PC reduzierte ADP-stimulierte Respiration auf. Dies könnte auf eine verminderte CPT-Aktivität hinweisen, die nachfolgend untersucht wurde. Nach zwanzig Wochen unterschied sich die maximale Respiration mit PC und PCoA nicht.

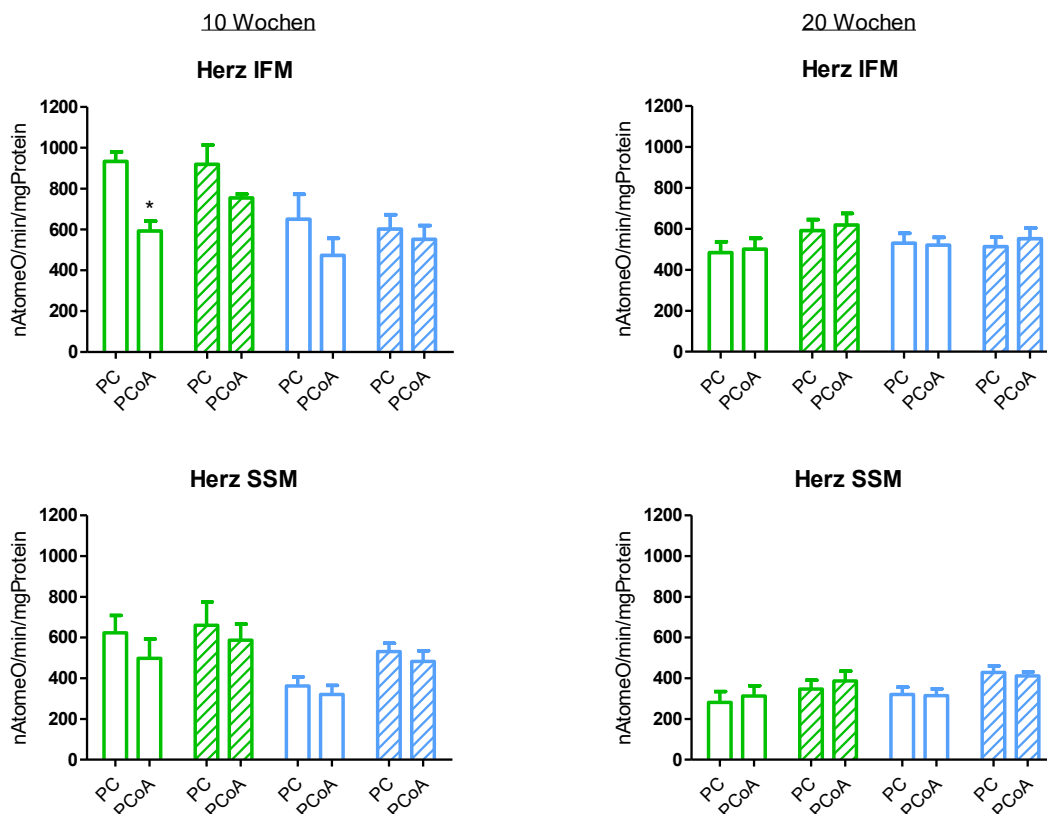


Abbildung 22 Respiratorische Kapazität mit den Substraten PC und PCoA. Maximale Respiration kardialer IFM und SSM nach zehn und zwanzig Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. Grüne Balken: HCR-High capacity runners, Blaue Balken: LCR-Low capacity runners, Schraffur: TAC-Tiere. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. Unterschiede in der Nutzung von PC/PCCoA wurden mittels Student's T-Test ermittelt. n=5-10; ns-nicht signifikant, *p < 0,05

Die Aktivität der Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT) im Herzmuskel ist entscheidend für die mitochondriale Fettsäureaufnahme und könnte eine unterschiedliche Nutzung der Substrate PC und PCoA bei HCR erklären. Abbildung 23 zeigt jedoch keine reduzierte CPT-Aktivität der HCR gegenüber der LCR. Zehn Wochen TAC

reduzierten die CPT-Aktivität bei HCR. Nach 20 Wochen TAC bestanden keine Unterschiede in den Transporteraktivitäten.

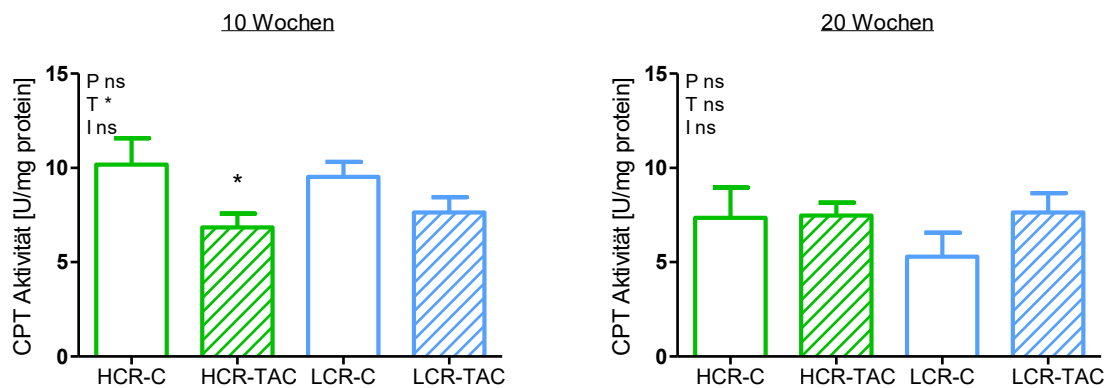


Abbildung 23 CPT-Gesamtaktivität des Herzmuskelgewebes. nach zehn und zwanzig Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=4; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.9 Aktivität antioxidativer Enzyme

Abbildung 24 zeigt die kardialen Aktivitäten der drei antioxidativen Enzyme SOD, Katalase und GPx. Dargestellt sind die vier untersuchten Gruppen nach 10 und 20 Wochen TAC. Nach 10 Wochen bereits angedeutet, erhöhte TAC nach 20 Wochen die Enzymaktivität der Katalase beider Phänotypen deutlich. Die Aktivität der GPx wurde durch TAC zunächst nur bei HCR leicht erhöht und sank bei LCR sogar ab. Nach 20 Wochen wurde eine signifikante Aktivitätssteigerung in beiden Phänotypen gemessen. TAC hatte keinen Einfluss auf die Aktivität der SOD.

Phänotypisch unterschieden sich HCR und LCR erst nach 20 Wochen. LCR zeigten dabei gegenüber HCR erhöhte Katalase- und SOD-Aktivitäten. Die Aktivität der GPx war zu diesem Zeitpunkt bei LCR jedoch geringer.

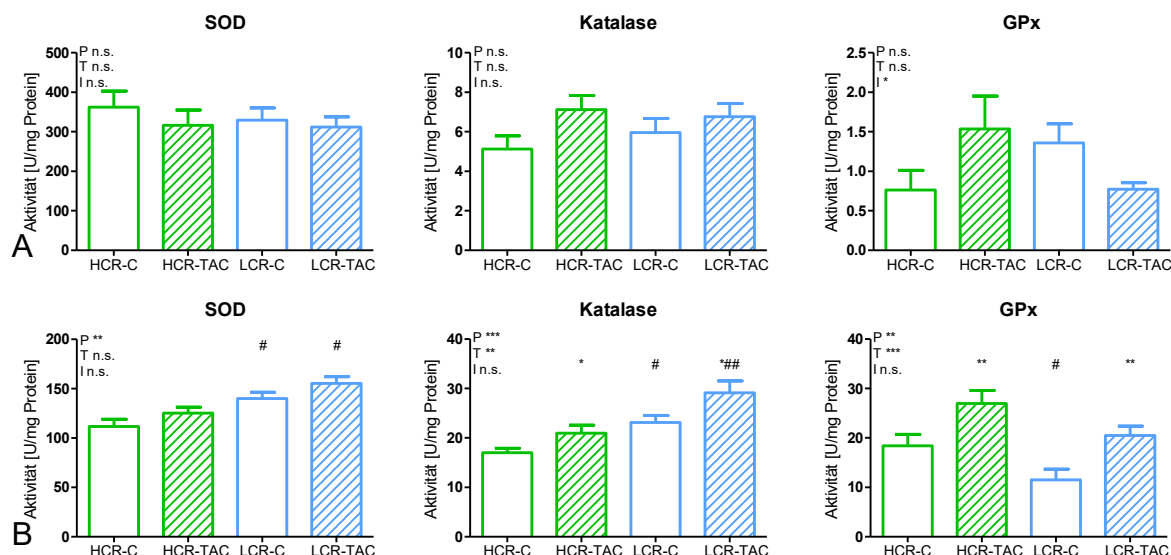


Abbildung 24 Aktivität kardialer antioxidativer Enzyme. Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase (GPx). Enzymaktivitäten nach zehn (A) und zwanzig Wochen (B) transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=7-8; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.10 Isolierte Herzperfusion

Tabelle 11 zeigt die Herzleistung sowie Substratoxidation und den ATP-Verbrauch nach zwei Wochen TAC. HCR- und LCR-Kontrolltiere unterschieden sich dabei nicht voneinander. TAC reduzierte die Fettsäureoxidation beider Phänotypen, hatte aber keinen Einfluss auf deren Herzleistung oder ATP-Verbrauch je Leistung.

Tabelle 11 Isoliert arbeitende Herzen nach zwei Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen.

Parameter	HCR-C	HCR-TAC	LCR-C	LCR-TAC	Statistik		
					P	T	I
Herzleistung [mW]	3,85±0,33	3,72±0,45	3,92±0,59	3,04±0,46	ns	ns	ns
Glukoseoxidation [μmol/min/g]	0,45±0,11	0,55±0,15	0,27±0,06	0,74±0,13**	ns	*	ns
Fettsäureoxidation [μmol/min/g]	1,47±0,09	0,86±0,16*	1,34±0,17	0,91±0,19	ns	*	ns
GO vor/nach Insulin [Faktor]	1,83±0,81	1,97±0,83	3,87±1,04	1,04±0,33	ns	ns	ns
FSO vor/nach Insulin [Faktor]	1,02±0,12	0,83±0,02	0,87±0,13	0,67±0,13	ns	*	ns
ATP-Verbrauch/Leistung [μmol/min/mW]	0,97±0,33	0,80±0,15	1,00±0,41	0,71±0,31	ns	ns	ns

HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners, GO-Glukoseoxidation, FSO-Fettsäureoxidation, P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. n=8; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

Abbildung 25 zeigt Ergebnisse der isolierten Herzperfusion nach zehn Wochen TAC und entsprechender Kontrollen. Es zeigte sich eine geringere Herzleistung der HCR gegenüber LCR. Die basale kardiale Glukose- und Fettsäureoxidation und der ATP-Verbrauch unterschieden sich zwischen den Phänotypen nicht. TAC reduzierte die Herzleistung beider Phänotypen deutlich. Nur bei HCR führte TAC zu einem stark erhöhten ATP-Verbrauch je Leistung, was eine geringere Effizienz der HCR verdeutlicht. Neben einer länger erhaltenen kardialen Funktion weisen LCR somit auch eine höhere Effizienz und Leistung der Herzen auf als HCR, was wieder mit deren längerem Überleben verbunden sein kann.

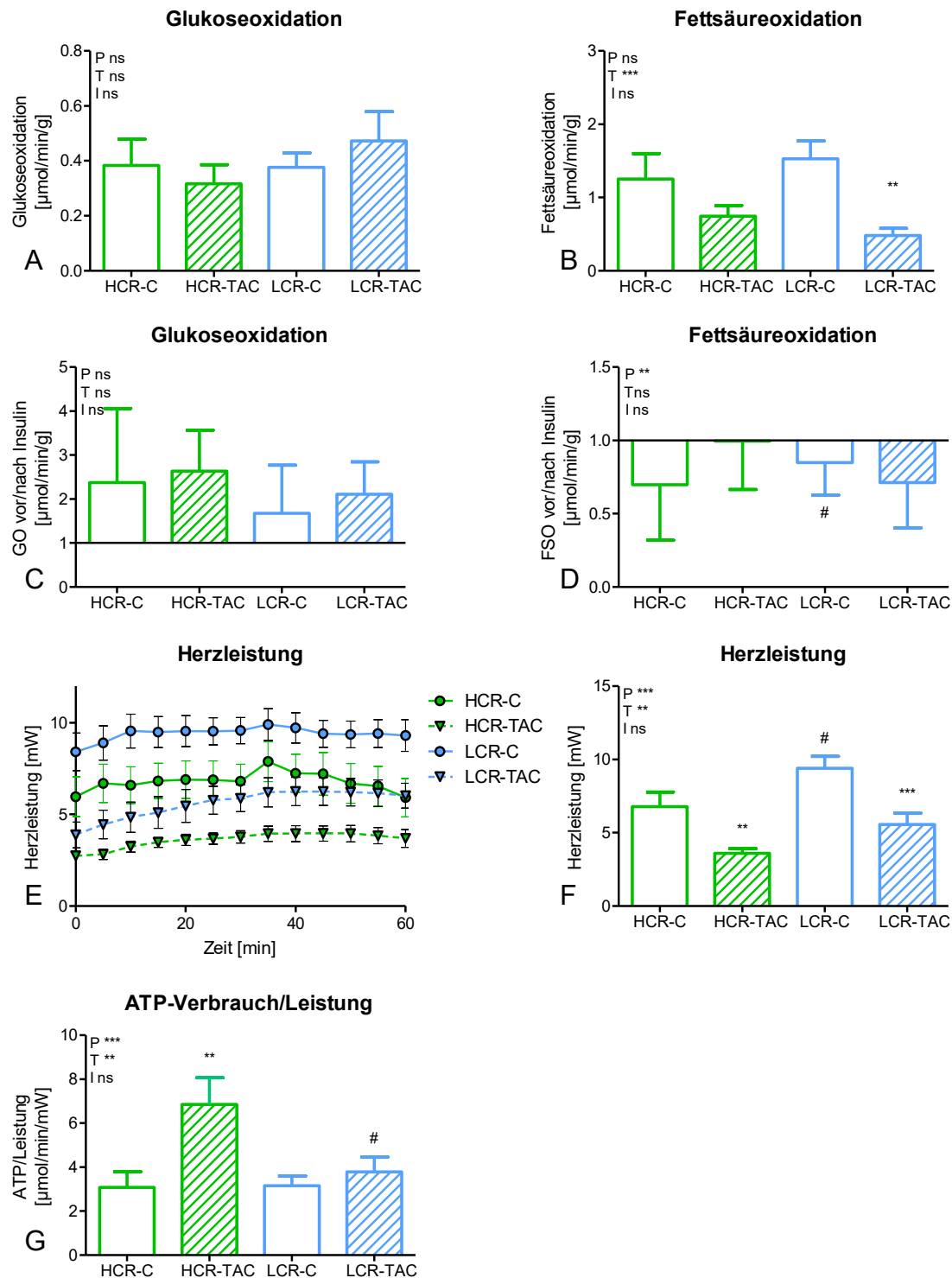


Abbildung 25 Isoliert arbeitende Herzen nach zehn Wochen transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. Glukoseoxidation (A), Fettsäureoxidation (B), Veränderung der Glukoseoxidation nach Insulinstimulation (C), Veränderung der Fettsäureoxidation nach Insulinstimulation (D), Herzleistung im zeitlichen Verlauf von 60 Minuten (E), Herzleistung gemittelt (F), Veränderung der ATP-Produktion nach Insulinstimulation bezogen auf die Herzleistung (G). HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners, P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. n=7-8; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

3.11 Histologie

Abbildung 26 zeigt die Masson-Trichrome Färbung des linken Ventrikels. Sie entsprach unabhängig von Phänotyp und TAC einen Kollagenanteil von ca. 2-3% der Gesamtfläche. TAC verursachte nach 10 Wochen keine vermehrte Kollageneinlagerung.

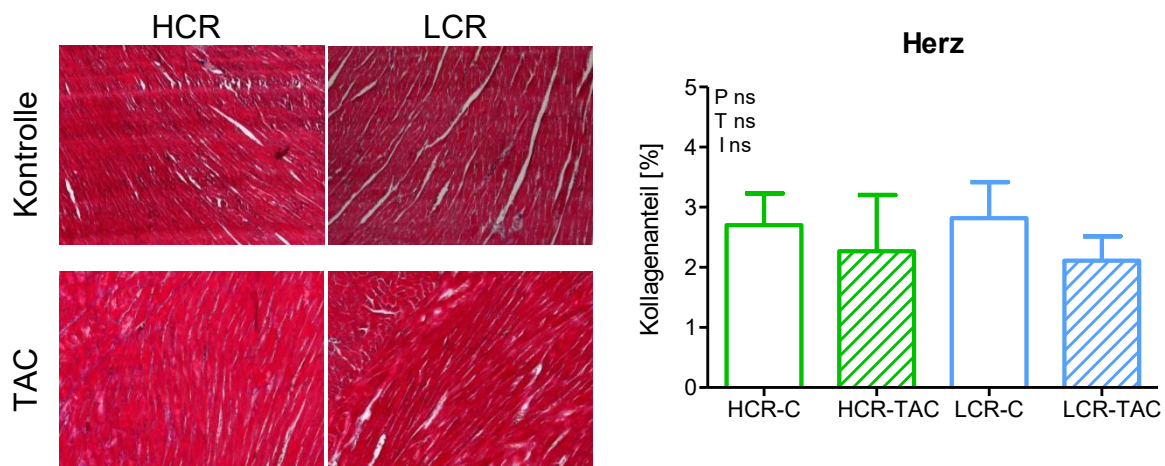


Abbildung 26 Strukturelle Veränderung des Myokards des linken Ventrikels. Masson-Trichom Färbung als Marker für Fibrose. Maßstab 100 μ m. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=7-8; ns-nicht signifikant

Abbildung 27 zeigt eine deutliche Zunahme der Gewebeoberfläche der Lunge bei HCR-TAC. Die Schnitte zeigten zelluläre Infiltrationen ohne Zunahme der Fibrose. stärkere Stauung bei Linksherzversagen

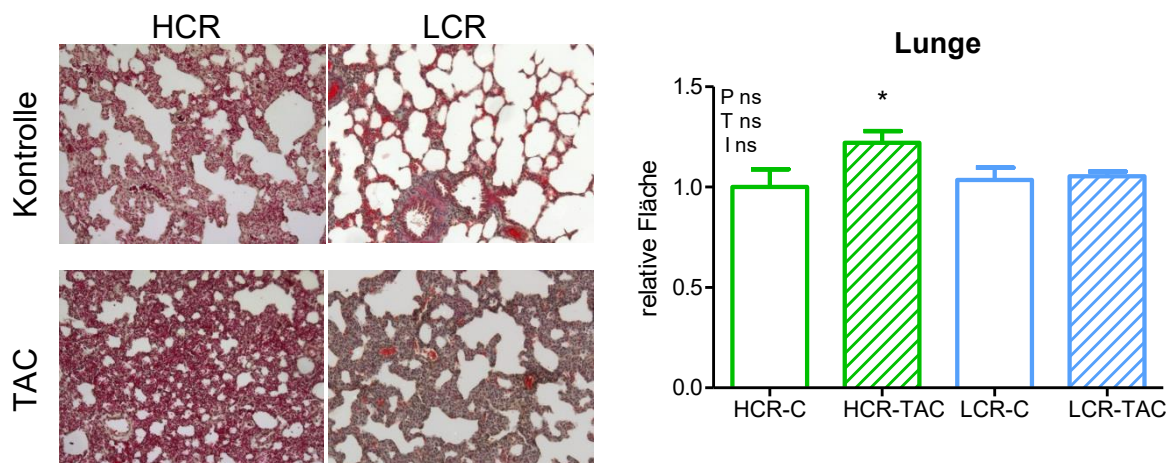


Abbildung 27 Strukturelle Veränderung des Lungengewebes. Masson-Trichom Färbung als Marker für Fibrose. Maßstab 100 μ m. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=3-4; ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine genetische Prädisposition für hohe aerobe Leistungsfähigkeit nicht durch eine gesteigerte Toleranz gegenüber Drucküberlastung gekennzeichnet ist. Das längere Überleben der LCR unter Druckbelastung ist mit einer verzögerten Einschränkung der systolischen kardialen Funktion, einer Steigerung der maximalen mitochondrialen Respiration und einer effizienteren ATP-Verwendung assoziiert.

Der Einfluss der genetisch bedingten Ausdauerkapazität auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz konnte bisher nicht isoliert untersucht werden. Somit gibt diese Arbeit zum ersten Mal Informationen zur kardialen und mitochondrialen Funktion sowie zum kardialen Substratstoffwechsel in Abhängigkeit von der genetischen Prädisposition für Ausdauerkapazität. Kontroll-LCR wiesen eine leicht höhere kontraktile Funktion als HCR auf. Insgesamt unterschied sich die kardiale Funktion von Kontroll-HCR und -LCR jedoch kaum. Die kardiale Funktion wurde nicht durch den Phänotyp hoher und niedriger Ausdauerkapazität bestimmt. Im Gegensatz zur Genetik ist der protektive und therapeutische Einfluss von körperlicher Fitness und sportlichem Training auf kardiovaskuläre Erkrankungen jedoch hinreichend bekannt (Blair *et al.* 1989, Edelmann *et al.* 2011, Zeitler *et al.* 2015). Einzelne Humanstudien fanden zwar keinen Zusammenhang zwischen Ausdauertraining und verbesserter Lebensqualität von Patienten (Prescott *et al.* 2009, Nilsson *et al.* 2010, Seljeflot *et al.* 2011). Eine große Meta-Analyse ergab jedoch, dass sportliche Betätigung das Gesamt-Sterblichkeitsrisiko und das Risiko für Bluthochdruck und Herzinfarkt um 30% senkt (Warburton *et al.* 2010). Körperliche Inaktivität ist der vierthäufigste Risikofaktor für Sterblichkeit weltweit. Zusammen mit Bluthochdruck, erhöhter Blutglukose und Übergewicht bedingen diese Lebensstil assoziierten Risiken knapp ein Drittel aller Todesursachen (WHO 2009, 2010). Diese Arbeit konnte mit dem Modell der HCR und LCR zeigen, dass allein die hohe genetisch bedingte körperliche Leistungsfähigkeit keinen protektiven Effekt gegenüber der niedrigen auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz hat.

Kardiale Drucküberlastung führte bereits nach zwei Wochen zu einer ausgeprägten Hypertrophie, die sich zwischen den Phänotypen nicht unterschied. Kardiale Hypertrophie wird generell als ein Prozess zwischen Adaptation und Pathologie betrachtet (Dirkx *et al.* 2011). In dem hier verwendeten Modell der Aortenkonstriktion

wird deutlich, dass eine zunächst kompensierte Hypertrophie mit starker Zunahme der Ventrikelwandstärke vorliegt. Die Wandstärken nehmen darauf hin nicht weiter zu, aber die systolischen Ventrikellinnendurchmesser vergrößern sich. Es wurde bereits gezeigt, dass langandauernde Aortenstenose zur Dilatation des linken Ventrikels führt und von zunächst konzentrischer zu exzentrischer Hypertrophie übergeht (Opie *et al.* 2006). Die Hypertrophie stellt demnach einerseits einen kompensatorischen Mechanismus des Herzens dar um die geforderte Leistung zu erreichen. Zum anderen ist sie ein Risikofaktor der die Entwicklung der Herzinsuffizienz begünstigt (Vakili *et al.* 2001). Die kompensierte Hypertrophie wird als intermediäres Stadium betrachtet, auf das bei Voranschreiten der strukturellen Veränderungen eine systolische Dysfunktion folgt (Berenji *et al.* 2005). Es wird sogar diskutiert, ob die zunehmende Hypertrophie während einer Aortenstenose eher einer Maladaptation entspricht und das Voranschreiten der systolischen Dysfunktion sogar begünstigt (Kupari *et al.* 2005). Trotz gleicher Entwicklung der Hypertrophie weisen in dieser Studie HCR deutlich früher Einschränkungen der diastolischen Funktion auf als LCR. Auch das Ausmaß der systolischen Beeinträchtigung scheint bei HCR etwas größer als bei LCR, trotz zeitlich ähnlichem Verlauf. Damit liegt nahe, dass die intrinsische Ausdauerkapazität das Maß der Hypertrophie nicht bedingt und die weitere Entwicklung der kardialen Funktion nicht unmittelbar davon abhängig ist.

Einschränkungen der kardialen Funktion zeigten sich zuerst bei der diastolischen Funktion. Hier wiesen zunächst besonders HCR durch die Erhöhung der Verhältnisse E/A und E/e' eine diastolische Dysfunktion auf. Beide Phänotypen zeigten im weiteren Verlauf bis 20 Wochen nach TAC deutliche Beeinträchtigungen der diastolischen Funktion. Diese funktionellen Einschränkungen des Herzens zeigten sich auch morphologisch. TAC steigerte das Lungengewicht beider Phänotypen, welches möglicherweise aus einem Rückstau in die Lunge resultierte. Histologische Untersuchungen ergaben jedoch nur bei HCR eine Zunahme der Gewebedichte der Lunge. Es wurde bereits gezeigt, dass ein struktureller Umbau der Lunge mit einem gesteigerten Verhältnis des diastolischen Parameters E/DT assoziiert ist (Nguyen *et al.* 2013). Da sowohl HCR als auch LCR zum Zeitpunkt der histologischen Untersuchungen einen deutlichen Anstieg von E/DT aufwiesen, trifft diese Assoziation hier nur für HCR zu. LCR wiesen trotz bestehenden diastolischen Einschränkungen keine strukturellen Änderungen der Lunge auf. HCR-TAC und LCR-TAC wiesen insgesamt einen ähnlichen Verlauf der diastolischen Dysfunktion

auf. Das lässt vermuten, dass das unterschiedliche Überleben der Phänotypen nicht durch die diastolische Funktion bedingt wurde. Im Vergleich zur diastolischen Funktion scheint die genetisch bedingte Ausdauerkapazität die systolische Funktion stärker zu beeinflussen. Sie unterschied sich zwischen den Phänotypen bereits in der initialen Reaktion auf TAC. LCR zeigten nach zwei Wochen einen leichten Anstieg der Kontraktilität (EF und FS). Ähnliche Beobachtungen sind auch aus vorherigen Studien bekannt (Doenst *et al.* 2010, Schrepper *et al.* 2012, Schwarzer *et al.* 2014). Dieser Effekt blieb bei HCR jedoch aus. Im weiteren Verlauf zeigten LCR generell eine deutlich länger erhaltene systolische Funktion als HCR. Hohe genetisch bedingte Ausdauerkapazität trug hier somit nicht zum Erhalt der systolischen Funktion bei. In klinischen Interventionsstudien hingegen wurde die systolische kardiale Funktion von Patienten mit Herzinsuffizienz durch Ausdauertraining verbessert (Hambrecht *et al.* 2000). Der selbe Einfluss wurde zudem in einer Metaanalyse bestätigt (Haykowsky *et al.* 2007). Genetisch bedingte hohe körperliche Ausdauerkapazität führte allerdings nicht zu einer besser erhaltenen Kontraktilität bei Drucküberlastung. Im Gegenteil, hier zeigten LCR eine länger aufrecht erhaltene systolische Funktion, was einen möglichen Grund für ihr längeres Überleben darstellt.

Die echokardiografisch gemessene höhere Kontraktilität der LCR konnte auch während der isolierten Herzperfusion festgestellt werden. Herzen der LCR wiesen stets eine höhere Leistung auf als die der HCR. Dies widerspricht zwar einer Arbeit, die ein größeres Auswurfvolumen bei HCR beschrieb (Hussain *et al.* 2001), es spiegelt jedoch deutlich die stets höhere echokardiografisch bestimmte systolische Funktion der LCR wider. Die isoliert arbeitenden Herzen der HCR und LCR zeigten eine vergleichbare Glukose- und Fettsäureoxidationen. Dies entspricht einer vorherigen Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe mit 21 Wochen alten HCR und LCR (Schwarzer *et al.* 2010). Andere Gruppen fanden ebenfalls keinen Unterschied zwischen HCR und LCR während der Herzperfusion (Noland *et al.* 2007). Hypertrophie, wie sie durch TAC vorliegt, geht jedoch mit einer veränderten Substratoxidation im ex vivo arbeitenden Herz einher (Bugger *et al.* 2010, Doenst *et al.* 2010). Die TAC-Tiere beider Phänotypen zeigten nach zwei und zehn Wochen eine reduzierte Fettsäureoxidation. Arbeiten von Doenst *et al.* (1999a) unterstützen diese Ergebnisse. Eine zusätzliche Steigerung der Glukoseoxidation wie bei Lopaschuk *et al.* (2010) wurde hier nur nach zwei Wochen TAC gemessen. Die

Glukoseoxidationsraten von HCR und LCR waren auch während TAC weiterhin vergleichbar und zur jeweiligen Kontrollgruppe unverändert. LCR zeigten mit höherer Herzleistung, in Kombination mit einer ähnlichen Glukose- und Fettsäureoxidation wie HCR, somit eine deutlich effektivere Substratnutzung als HCR.

Herzinsuffizienz ist mit einer verminderten systemischen Insulinsensitivität verbunden (Liu *et al.* 2001, Ilercil *et al.* 2002), die sogar direkt mit dem NYHA-Stadium von Patienten korreliert (Alzadjali *et al.* 2009). LCR-Kontrolltiere wiesen mit einer gegenüber HCR erhöhten basalen Blutglukose und geringeren Glukosetoleranz Zeichen eines gestörten Glukosestoffwechsels auf. Diese Ergebnisse werden durch vorherige Experimente gestützt (Noland *et al.* 2007, Schwarzer *et al.* 2010, Ritchie *et al.* 2012). Weiterführende Analysen zeigten zwar eine verminderte kardiale IR-Phosphorylierung der LCR, die gesteigerte Expression des Downstream-Signals Akt kann jedoch als ein kompensatorischer Mechanismus betrachtet werden. Verbunden mit einer zwischen HCR und LCR vergleichbaren Glukose- und Fettsäureoxidation in isolierten, arbeitenden Herzen, ist davon auszugehen, dass die kardiale Insulinempfindlichkeit der LCR nicht gestört ist. Dies unterstützt ein Konzept für unterschiedliche Mechanismen bei der Entstehung von systemischer und kardialer Insulinresistenz (Utriainen *et al.* 1998, Gargiulo & Perrone-Filardi 2018). TAC führte nach zehn Wochen bei HCR und LCR zu einer leicht gesteigerten Glukosetoleranz. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Liew *et al.* (2017) zu frühen Zeitpunkten nach TAC. Sie führten dies auf eine bessere Insulinsignalfunktion in der Leber und im Fettgewebe zurück. Nach 20 Wochen TAC zeigten nur LCR weiterhin eine im Vergleich zur Kontrolle gesteigerte Glukosetoleranz. Die TAC reduzierte die Phosphorylierung des kardialen Insulinrezeptors und somit die Insulinsensitivität der HCR. LCR wiesen zwar basal eine gestörte Glukosetoleranz und höheren basalen Blutzucker auf. TAC schränkte jedoch ihren Glukosestoffwechsel weniger ein, als den der HCR. LCR waren in der Lage die Glukosetoleranz während der TAC aufrecht zu erhalten und sogar leicht zu steigern. Die unbeeinträchtigte Glukosehomöostase der LCR könnte neben der erhaltenen systolischen Funktion somit ein weiterer Faktor sein, der ihr längeres Überleben bewirkt.

Neben der Insulinempfindlichkeit wird besonders die mitochondriale respiratorische Funktion als zweiter wichtiger Einflussfaktor auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz gesehen. Im Vordergrund stehen dabei nicht nur energetische Aspekte wie eine

ausreichende ATP-Produktion (Ingwall & Weiss 2004), sondern auch die Entstehung und Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies (Chen & Zweier 2014). Die Mitochondriendichte eines Gewebes wird durch die Citratsynthaseaktivität als Markerenzym bestimmt (Karabatsiakos *et al.* 2014). Sie blieb bei HCR und LCR in allen drei Geweben und zu jedem Zeitpunkt. Obwohl einerseits gezeigt wurde, dass HCR eine höhere Citratsynthaseaktivität haben (Rivas *et al.* 2011) und eine höhere Mitochondriendichte im Gewebe aufweisen (Seifert *et al.* 2012), fanden andere auch keinen Unterschied zwischen den Phänotypen (Morris *et al.* 2009). TAC veränderte in dieser Arbeit die Citratsynthaseaktivität des Herzens zu keinem Zeitpunkt. Ähnliche Ergebnisse lieferten andere Studien auch (Ide *et al.* 2001, Scheubel *et al.* 2002, Rosca *et al.* 2008). Die gleichbleibende Mitochondriendichte spricht gegen eine veränderte mitochondriale Biogenese während der Herzinsuffizienz, wie sie häufig beschrieben wurde (Rimbaud *et al.* 2009, Chaanine *et al.* 2017). TAC reduzierte jedoch die Größe und insbesondere die Komplexität der Mitochondrien der LCR. Auch andere Veröffentlichungen zeigen eine verringerte Größe der Mitochondrien (Drexler *et al.* 1992, Goh *et al.* 2015). Dabei gingen die Autoren davon aus, dass die Verbindungen der Mitochondrien abnehmen und Prozesse des Koppelns (Fusion) und Lösens (Fission) komplexer Mitochondrien verlangsamt sind. Im Gegensatz zu Drexler *et al.* (1992), gingen die Veränderungen bei LCR nicht mit einer beeinträchtigten kardialen oder mitochondrialen Funktion einher.

Der Befund, dass sich IFM und SSM hinsichtlich bestimmter Eigenschaften unterscheiden (Palmer *et al.* 1985), wird auch im Modell der HCR und LCR deutlich. Die beschriebenen strukturellen Änderungen durch TAC wurden besonders bei SSM deutlich. IFM hingegen zeigten deutlichere Veränderungen der respiratorischen Kapazität der Mitochondrien. HCR und LCR wiesen bereits nach zwei Wochen TAC erste Unterschiede in der respiratorischen Kapazität des *M. gastrocnemius* auf. Erst nach zehn Wochen zeigten HCR mit allen eingesetzten Substraten eine höhere respiratorische Kapazität der IFM des Skelettmuskels als LCR. Dies entspricht der bereits am *M. soleus* durchgeführten Untersuchung (Stephenson *et al.* 2012). Die Unterschiede können durch die geringere Ausstattung mit für die mitochondriale Biogenese notwendigen Transkriptionsfaktoren sowie oxidativer Enzyme der LCR erklärt werden (Koch & Britton 2005). LCR wiesen auch eine geringere mitochondriale Aktivität der Leber auf als HCR. Diese Daten entsprechen Ergebnissen einer bereits veröffentlichten Arbeit, in der die Autoren schlussfolgern,

dass geringere mitochondriale Aktivität der LCR möglicherweise durch eine gesteigerte peroxisomale Lipidoxidation kompensiert wird (Thyfault *et al.* 2009). Anders als bereits durch Schrepper *et al.* (2012) beschrieben, hatte eine TAC keinen Einfluss auf die maximale Respiration der Leber- und Skelettmuskelmitochondrien. Es wurde zwar bereits eine Reduktion der Skelettmuskelkraft der HCR bei Herzinsuffizienz gezeigt (Bowen *et al.* 2016). Die Messungen der mitochondrialen respiratorischen Kapazität des *M. gastrocnemius* in der hier vorliegenden Arbeit lassen jedoch nicht auf eine starke Beeinträchtigung des Skelettmuskels durch Drucküberlastung schließen. Im Herzen waren die phänotypischen Unterschiede der mitochondrialen Respiration zwischen HCR und LCR weniger ausgeprägt, als im Skelettmuskel und der Leber. Dies deutet möglicherweise auf eine hohe Reservekapazität des Herzens hin. HCR zeigten gegenüber LCR auch kardial eine tendenziell höhere ADP-stimulierte Respiration. Verschiedene Studien zeigen übereinstimmend eine reduzierte ADP-stimulierte Respiration während der Herzinsuffizienz (Sharov *et al.* 1998, De Sousa *et al.* 2000, Sharov *et al.* 2000, Garnier *et al.* 2003, Rosca *et al.* 2008, Faerber *et al.* 2011, Lemieux *et al.* 2011, Schrepper *et al.* 2012, Schwarzer *et al.* 2013, Stride *et al.* 2013). Im hier genutzten Modell führte TAC jedoch nicht zu starken Einschränkungen der mitochondrialen Funktion. Im Gegenteil, während Drucküberlastung waren besonders LCR in der Lage die mitochondriale Funktion schon frühzeitig zu steigern. HCR hingegen zeigten besonders in den IFM kurzfristig eine verminderte ADP-stimulierte Respiration mit einzelnen Substraten (Glu/Ma, PCoA/Ma, DHQ). Speziell die Verwendung der Substratkombination Pyruvat/Malat führte aber bei beiden Phänotypen zu einer gesteigerten ADP-stimulierten Respiration der Mitochondrien. Dies schließt eine Komplex I-Dysfunktion während Herzinsuffizienz, wie sie durch Scheubel *et al.* (2002) beschrieben wurde, im Modell der HCR und LCR aus. HCR wiesen mit dem Substrat PC meist eine höhere mitochondriale Respiration auf als mit dem CPT1-abhängigen Substrat PCoA. Die Enzymaktivität des CPT1 war bei HCR-TAC entsprechend reduziert. Kontrolltiere zeigten jedoch keine Einschränkung des CPT1. Außerdem ist die verstärkte PCoA-Respiration bei HCR nach 20 Wochen nicht gleichfalls auch mit einer höheren Transporteraktivität verbunden. Demnach scheint die CPT1-Aktivität die unterschiedliche Nutzung der Substrate PC und PCoA nicht vollständig zu erklären. Die maximale respiratorische Kapazität der Mitochondrien wird neben der Substratoxidationsrate gleichermaßen durch den

ATP-Umsatz bestimmt (Brand & Nicholls 2011). Die ADP-limitierte Respiration gibt dabei Aufschluss über die Intaktheit des Protonengradienten und das Wirken unspezifischer ATPasen, die ATP abbauen und somit die Rate der ADP-limitierten Respiration erhöhen (Brand & Nicholls 2011). TAC beeinflusste die ADP-limitierte Atmung nicht, wie bereits in ähnlichen Experimenten anderer Gruppen gezeigt wurde (Rosca *et al.* 2008). LCR wiesen aber häufig eine geringere ADP-limitierte Respiration auf als HCR und scheinen einen stabilen Protonengradienten somit besser aufrechterhalten zu können als HCR. Die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung wird über das ADP/O-Verhältnis bewertet. Es ist unabhängig von der absoluten Respirationsrate und wird als sensibler Parameter für die mitochondriale Kopplung beschrieben (Murray *et al.* 2008). Diese unterschied sich zwischen HCR und LCR nicht. LCR wiesen nach 20 Wochen TAC einen erhöhten ADP/O auf. Auch Rosca *et al.* (2008) zeigten unveränderte ADP/O-Verhältnisse während der Herzinsuffizienz, obwohl einzelne weitere Studien eine Reduktion des ADP/O während der Herzinsuffizienz zeigten (Murray *et al.* 2008). Die Kopplung zwischen Oxidation und Phosphorylierung scheint demnach während Drucküberlastung bei HCR und LCR erhalten zu bleiben und hat somit keinen Einfluss auf deren unterschiedliches Überleben.

Selbst bei intakter mitochondrialer Respiration entstehen reaktive Sauerstoffspezies als Nebenprodukt. Antioxidative Systeme tragen daher entscheidend dazu bei ROS-verursachte Schäden zu vermeiden. LCR wiesen mit steigendem Alter und Manifestation des Phänotyps höhere SOD- und Katalaseaktivitäten im Herzen auf als HCR. Bisherige Veröffentlichungen mit diesem Modell befassten sich lediglich mit dem Skelettmuskel und zeigten eine höhere antioxidative Kapazität bei HCR (Tweedie *et al.* 2011). Die GPx-Aktivität war, im Gegensatz zur SOD und Katalase, bei LCR reduziert. Die GPx-Aktivität ist durch ihre Beteiligung am Glutathion- Zyklus eng mit der nicht- enzymatischen Antwort verknüpft und soll eine wichtige Rolle bei der Adaptation an veränderte körperliche Leistung spielen (Elokda & Nielsen 2007). Möglicherweise legt dies auch die unterschiedliche Aktivität bei HCR und LCR nahe. Das Eintreten der Herzinsuffizienz resultierte bei beiden Phänotypen in einer gesteigerten Aktivität aller antioxidativen Enzyme. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Arbeiten, die eine mit Herzinsuffizienz abnehmende antioxidative Kapazität beschrieben (Hill & Singal 1996). Herzinsuffizienz wurde aber bereits mit steigendem oxidativem Stress assoziiert (Schwarzer *et al.* 2014). Oxidativer Stress

führt zu einer Hochregulation der enzymatischen antioxidativen Antwort und scheint demnach eine Anpassung an die gesteigerte ROS-Produktion während der Drucküberlastung zu sein (Ji *et al.* 2006). Die bereits vorab höhere antioxidative Kapazität der LCR, könnte damit eine schnelle Anpassung an gesteigerte ROS ermöglichen und ein weiterer Grund für ihr längeres Überleben bei Herzinsuffizienz sein. Im Sinne des Hormesis-Konzepts gilt, dass geringe Mengen eines toxischen/schädlichen Stressors, wie gesteigerte ROS, einen gesundheitsfördernden Effekt haben und ein vermindertes Auftreten von Erkrankungen bis hin zur Lebensverlängerung bewirken (Edward & Linda 1997, Calabrese & Baldwin 2003). Aufgrund der höheren SOD- und Katalaseaktivität der LCR ist anzunehmen, dass diese dauerhaft einer gesteigerten ROS-Produktion ausgesetzt sind und eine entsprechend höhere antioxidative Kapazität aufweisen. Auf einen akuten Stressor, wie ihn die Induktion der Drucküberlastung darstellt, können LCR somit effektiver reagieren.

Übergewichtige und adipöse Menschen sind doppelt so häufig von kardiovaskulären Erkrankungen betroffen wie normalgewichtige (Kenchiah *et al.* 2002). Bei bereits diagnostizierter koronarer Herzinsuffizienz haben Übergewichtige und adipöse Patienten jedoch ein geringeres Risiko an kardiovaskulären Erkrankungen zu versterben als normalgewichtige (Fonarow *et al.* 2007). Dieser Zusammenhang wird als *Obesity-Paradox* bezeichnet. Er wurde in zusammenfassenden Analysen mehrerer Arbeiten bestätigt und ergab zusätzlich ein geringeres Risiko an nicht-kardiovaskulären Ursachen zu versterben (Oreopoulos *et al.* 2008, Nagarajan *et al.* 2016). Die Berücksichtigung des *Obesity Paradox* stellt eine Möglichkeit dar zu erklären, warum die in diesem Sinne übergewichtigen, mit Risikofaktoren behafteten LCR eine Drucküberlastung besser und länger tolerieren und überleben als HCR. Da HCR und LCR gleichermaßen einer TAC unterzogen und einer Drucküberlastung ausgesetzt wurden, wurde hier der Überlebensvorteil der LCR unabhängig vom initial höheren Risiko zu erkranken deutlich. Im Zusammenhang mit dem *Obesity Paradox* wird zunehmend die körperliche Fitness von Patienten als ein weiterer Aspekt diskutiert. Übergewicht ist demnach in Verbindung mit hoher muskulärer und kardiorespiratorischer Fitness ein Überlebensvorteil bei kardiovaskulären Erkrankungen (Pandey *et al.* 2015). Das Modell der LCR scheint jedoch zu widerlegen, dass dabei die körperliche Fitness zum längeren Überleben führte.

Der bereits sehr frühe Unterschied im Überleben zwischen HCR-TAC und LCR-TAC kann ein Hinweis dafür sein, dass HCR vor allem während der frühen Phase der Entwicklung einer Herzinsuffizienz benachteiligt sind. Diese frühe Phase der kompensierten Herzfunktion ist durch Hypertrophie und eine oftmals gesteigerte Herzleistung und mitochondriale Funktion gekennzeichnet. Möglicherweise sind HCR gerade in dieser Phase den schnellen Anpassungsmechanismen nicht gewachsen. Die genetische Prädisposition für hohe körperliche Leistungsfähigkeit konnte im Vergleich zur niedrigen Leistungsfähigkeit die Entwicklung einer Herzinsuffizienz weder verzögern noch verhindern.

Betrachtung methodischer Limitationen

Die Aortenstenose ist eine der Hauptursachen für Hypertrophie und resultierende Herzinsuffizienz. Die Erzeugung einer Stenose und der aus der Drucküberlastung resultierenden Hypertrophie ist demnach eine sehr gute Methode, das klinische Bild der Herzinsuffizienz experimentell zu untersuchen. Die transverse Aortenkonstriktion mittels Ligaturzange ist dabei methodisch sehr gut geeignet. Sie ist gut durchführbar und resultiert in einer über lange Zeiträume hinweg reproduzierbaren Aortenstenose. Durch alternative Methoden wie Abbinden der Aorta ist dies nicht gegeben (Marano & Ferrari 2007, Tarnavski 2009). Die unveränderten Lebergewichte lassen den Schluss zu, dass kein Rückstau in die Leber stattgefunden hat. Ein gesteigertes Lebergewicht, verursacht durch eine passive Leberstauung, ist meist mit einer Rechtsherzinsuffizienz assoziiert (Barrick *et al.* 2007). Es ist demnach davon auszugehen, dass die TAC erwartungsgemäß eine Linksherzinsuffizienz verursacht hat und resultierende Effekte ausschließlich darauf zurückzuführen sind. Die durch die TAC induzierte kardiale Drucküberlastung stellt ein chronisches Modell zur Entwicklung der Herzinsuffizienz dar. Dennoch sollte berücksichtigt werden, dass die Applikation der TAC, verbunden mit der postoperativen Anpassung, auch ein akutes Ereignis für das individuelle Tier darstellt. In dieser Arbeit wurden jedoch keine unterschiedlichen postoperativen Reaktionen auf die TAC beobachtet. HCR und LCR wurden durch TAC gleichermaßen einer Drucküberlastung ausgesetzt. Nur dieses Vorgehen lässt es zu deren Entwicklung einer Herzinsuffizienz zu vergleichen. Es bleibt dabei jedoch unberücksichtigt, dass HCR und LCR natürlicherweise nicht dasselbe Risiko haben eine Drucküberlastung zu entwickeln.

Schlussfolgerung

Entgegen den Erwartungen ist genetisch bedingte hohe Ausdauerkapazität nicht mit einer erhöhten Toleranz gegenüber Drucküberlastung verbunden. Die intrinsische Ausdauerkapazität hatte keinen Einfluss auf die Ausprägung der Hypertrophie und den Verlauf der diastolischen kardialen Funktion. Die länger erhaltene systolische Funktion in Verbindung mit einer höheren Herzleistung bei gleicher Substratnutzung könnte jedoch das bessere Überleben der LCR begünstigt haben. LCR zeigten zudem eine effizientere mitochondriale Funktion. In Verbindung mit einer zusätzlich höheren antioxidativen Kapazität, lassen sich bessere Anpassungsmechanismen der LCR vermuten.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abel ED (2005): Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders 5, 219-226
- Alzadjali MA, Godfrey V, Khan F, Choy A, Doney AS, Wong AK, Petrie JR, Struthers AD, Lang CC (2009): Insulin Resistance Is Highly Prevalent and Is Associated With Reduced Exercise Tolerance in Nondiabetic Patients With Heart Failure. Journal of the American College of Cardiology 53, 747-753
- Barrick CJ, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth SS, Threadgill DW (2007): Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology 292, H2119-30
- Belch JJ, Bridges AB, Scott N, Chopra M (1991): Oxygen free radicals and congestive heart failure. British Heart Journal 65, 245-248
- Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA (2005): Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 289, H8-H16
- Bieber LL, Abraham T, Helmrath T (1972): A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. Anal Biochem 50, 509-18
- Blair SN, Kohl HW, Iii, Paffenbarger RS, Jr, Clark DG, Cooper KH, Gibbons LW (1989): Physical fitness and all-cause mortality: A prospective study of healthy men and women. JAMA 262, 2395-2401
- Boudina S, Abel ED (2006): Mitochondrial Uncoupling: A Key Contributor to Reduced Cardiac Efficiency in Diabetes. Physiology 21, 250-258
- Bowen TS, Eisenkolb S, Werner S, Schwarzer M, Schuler G, Adams V (2016): Inheriting a high aerobic fitness predisposes to skeletal muscle and endothelial dysfunction in chronic heart failure. International Journal of Cardiology 203, 353-356
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-54
- Brand MD, Nicholls DG (2011): Assessing mitochondrial dysfunction in cells. The Biochemical journal 435, 297-312
- Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR, Wiegand V (1990): Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. Eur Heart J 11, 509-16
- Buck T, Breithardt O-A, Faber L, Fehske W, Flachskampf FA, Franke A, Hagendorff A, Hoffmann R, Kruck I, Kücherer H, Menzel T, Pethig K, Tiemann K, Voigt J-U, Weidemann F, Nixdorff U (2009): Manual zur Indikation und Durchführung der Echokardiographie. Clinical Research in Cardiology Supplements 4, 3-51
- Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorim PA, Schoepe M, Nguyen TD, Mohr FW, Khalimonchuk O, Weimer BC, Doenst T (2010): Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. Cardiovascular Research 85, 376-384
- Calabrese EJ, Baldwin LA (2003): Hormesis: The Dose-Response Revolution. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 43, 175-197
- Chaanine AH, Sreekumaran Nair K, Bergen RH, Klaus K, Guenzel AJ, Hajjar RJ, Redfield MM (2017): Mitochondrial Integrity and Function in the Progression of

- Early Pressure Overload–Induced Left Ventricular Remodeling. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* 6, e005869
- Chance B, Williams GR (1955): Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation: I. Kinetics of Oxygen Utilization. *Journal of Biological Chemistry* 217, 383-394
- Chen Y-R, Zweier JL (2014): Cardiac Mitochondria and Reactive Oxygen Species Generation. *Circulation Research* 114, 524-537
- Clark LC, Wolf R, Granger D, Taylor Z (1953): Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography. *Journal of Applied Physiology* 6, 189-193
- Dai D-F, Johnson SC, Villarin JJ, Chin MT, Nieves-Cintrón M, Chen T, Marcinek DJ, Dorn GW, Kang YJ, Prolla TA, Santana LF, Rabinovitch PS (2011): Mitochondrial Oxidative Stress Mediates Angiotensin II–Induced Cardiac Hypertrophy and Gαq overexpression–Induced Heart Failure. *Circulation Research* 108, 837-846
- De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R (2000): Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation* 102, 1847-53
- Dirkx E, Schwenk RW, Glatz JFC, Luiken JJFP, van Eys GJJM (2011): High fat diet induced diabetic cardiomyopathy. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 85, 219-225
- Djoussé L, Kochar J, Gaziano JM (2007): Dietary factors and risk of heart failure: A systematic review. *Current Cardiovascular Risk Reports* 1, 330-334
- Doehner W, Rauchhaus M, Ponikowski P, Godsland IF, von Haehling S, Okonko DO, Leyva F, Proudler AJ, Coats AJ, Anker SD (2005): Impaired insulin sensitivity as an independent risk factor for mortality in patients with stable chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 46, 1019-26
- Doenst T, Holden JE, Taegtmeyer H (1999a): Limitations to the assessment of reperfusion injury with radiolabeled 2-deoxyglucose. *Circulation* 99, 1646-7
- Doenst T, Richwine RT, Bray MS, Goodwin GW, Frazier OH, Taegtmeyer H (1999b): Insulin improves functional and metabolic recovery of reperfused working rat heart. *The Annals of Thoracic Surgery* 67, 1682-1688
- Doenst T, Pytel G, Schrepper A, Amorim P, Färber G, Shingu Y, Mohr FW, Schwarzer M (2010): Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovascular Research* 86, 461-470
- Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H (1992): Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 85, 1751-1759
- Edelmann F, Gelbrich G, Dungen HD, Frohling S, Wachter R, Stahrenberg R, Binder L, Topper A, Lashki DJ, Schwarz S, Herrmann-Lingen C, Löffler M, Hasenfuss G, Halle M, Pieske B (2011): Exercise training improves exercise capacity and diastolic function in patients with heart failure with preserved ejection fraction: results of the Ex-DHF (Exercise training in Diastolic Heart Failure) pilot study. *J Am Coll Cardiol* 58, 1780-91
- Edward JC, Linda AB (1997): The Dose Determines the Stimulation (and Poison): Development of A Chemical Hormesis Database. *International Journal of Toxicology* 16, 545-559
- Elliott P, McKenna WJ (2004): Hypertrophic cardiomyopathy. *The Lancet* 363, 1881-1891
- Elokda AS, Nielsen DH (2007): Effects of exercise training on the glutathione antioxidant system. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14, 630-7

- Estabrook RW (1967): Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios, *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 41-47
- Faerber G, Barreto-Perreia F, Schoepe M, Gilsbach R, Schrepper A, Schwarzer M, Mohr FW, Hein L, Doenst T (2011): Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: reduced peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 141, 492-500, 500 e1
- Fischer-Rasokat U, Beyersdorf F, Doenst T (2003): Insulin addition after ischemia improves recovery of function equal to ischemic preconditioning in rat heart. *Basic Res Cardiol* 98, 329-336
- Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, Coke LA, Fleg JL, Forman DE, Gerber TC, Gulati M, Madan K, Rhodes J, Thompson PD, Williams MA (2013): Exercise Standards for Testing and Training. A Scientific Statement From the American Heart Association 128, 873-934
- Fonarow GC, Srikanthan P, Costanzo MR, Cintron GB, Lopatin M (2007): An obesity paradox in acute heart failure: Analysis of body mass index and in-hospital mortality for 108927 patients in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry. *American Heart Journal* 153, 74-81
- Frasier CR, Moore RL, Brown DA (2011): Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. *Journal of Applied Physiology* 111, 905-915
- Gargiulo P, Perrone-Filardi P (2018): "Heart failure, whole-body insulin resistance and myocardial insulin resistance: An intriguing puzzle". *Journal of Nuclear Cardiology* 25, 177-180
- Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R (2003): Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551, 491-501
- Giroux M-C, HÉlie P, Burns P, Vachon P (2015): Anesthetic and pathological changes following high doses of ketamine and xylazine in Sprague Dawley rats. *Experimental Animals* 64, 253-260
- Gnaiger E (2014): Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: An Introduction to OXPHOS Analysis ; Mitochondr Physiol Network 19.12. Oroboros Instruments
- Goh KY, Qu J, Hong H, Liu T, Dell'Italia LJ, Wu Y, O'Rourke B, Zhou L (2015): Impaired mitochondrial network excitability in failing guinea-pig cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* 109, 79-89
- Goyal B, Mehta A (2013): Diabetic cardiomyopathy: Pathophysiological mechanisms and cardiac dysfunction. *Human & Experimental Toxicology* 32, 571-590
- Griffiths ER, Friehs I, Scherr E, Poutias D, McGowan FX, Del Nido PJ (2010): Electron transport chain dysfunction in neonatal pressure-overload hypertrophy precedes cardiomyocyte apoptosis independent of oxidative stress. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 139, 1609-17
- Grubbs FE (1950): Sample Criteria for Testing Outlying Observations. 27-58
- Gustafsson I, Hildebrandt P (2001): Early Failure of the Diabetic Heart. *Diabetes Care* 24, 3-4
- Hafstad AD, Boardman NT, Lund J, Hagve M, Khalid AM, Wisløff U, Larsen TS, Aasum E (2011): High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart. *Journal of Applied Physiology* 111, 1235-1241

- Hambrecht R, Gielen S, Linke A, et al. (2000): Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure: A randomized trial. *JAMA* 283, 3095-3101
- Hassett RP, Crockett EL (2000): Endpoint fluorometric assays for determining activities of carnitine palmitoyltransferase and citrate synthase. *Anal Biochem* 287, 176-9
- Haykowsky MJ, Liang Y, Pechter D, Jones LW, McAlister FA, Clark AM (2007): A Meta-Analysis of the Effect of Exercise Training on Left Ventricular Remodeling in Heart Failure Patients. *Journal of the American College of Cardiology* 49, 2329-2336
- Hill MF, Singal PK (1996): Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *The American Journal of Pathology* 148, 291-300
- Hollander JM, Thapa D, Shepherd DL (2014): Physiological and structural differences in spatially distinct subpopulations of cardiac mitochondria: influence of cardiac pathologies. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 307, H1-14
- Holloszy JO (1967): Biochemical Adaptations in Muscle: EFFECTS OF EXERCISE ON MITOCHONDRIAL OXYGEN UPTAKE AND RESPIRATORY ENZYME ACTIVITY IN SKELETAL MUSCLE. *Journal of Biological Chemistry* 242, 2278-2282
- Holmuhamedov EL, Oberlin A, Short K, Terzic A, Jahangir A (2012): Cardiac Subsarcolemmal and Interfibrillar Mitochondria Display Distinct Responsiveness to Protection by Diazoxide. *PLOS ONE* 7, e44667
- Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O (2007): Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 14, 753-60
- Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW (2009): 2009 Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults. A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: Developed in Collaboration With the International Society for Heart and Lung Transplantation 119, e391-e479
- Husain K (2003): Interaction of physical training and chronic nitroglycerin treatment on blood pressure, nitric oxide, and oxidants/antioxidants in the rat heart. *Pharmacological Research* 48, 253-261
- Hussain SO, Barbato JC, Koch LG, Metting PJ, Britton SL (2001): Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 281, R1787-R1791
- Hwang C-L, Yoo J-K, Kim H-K, Hwang M-H, Handberg EM, Petersen JW, Christou DD (2016): Novel all-extremity high-intensity interval training improves aerobic fitness, cardiac function and insulin resistance in healthy older adults. *Experimental Gerontology* 82, 112-119
- Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A (1999): Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 85, 357-63

- Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A (2001): Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 88, 529-35
- Ilercil A, Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Howard BV (2002): Associations of Insulin Levels With Left Ventricular Structure and Function in American Indians. *The Strong Heart Study* 51, 1543-1547
- Ingelsson E, Sundström J, Ärnlöv J, Zethelius B, Lind L (2005): Insulin resistance and risk of congestive heart failure. *JAMA* 294, 334-341
- Ingwall JS, Weiss RG (2004): Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circulation research* 95, 135-145
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2006): Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 425-35
- Judge S, Jang YM, Smith A, Selman C, Phillips T, Speakman JR, Hagen T, Leeuwenburgh C (2005): Exercise by lifelong voluntary wheel running reduces subsarcolemmal and interfibrillar mitochondrial hydrogen peroxide production in the heart. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289, R1564-R1572
- Kannel W (2000): Incidence and Epidemiology of Heart Failure. *Heart Fail Rev* 5, 167-173
- Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP (1974): Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. *The American Journal of Cardiology* 34, 29-34
- Karabatsiakis A, Böck C, Salinas-Manrique J, Kolassa S, Calzia E, Dietrich DE, Kolassa IT (2014): Mitochondrial respiration in peripheral blood mononuclear cells correlates with depressive subsymptoms and severity of major depression. *Translational Psychiatry* 4, e397
- Karason K, Sjöström L, Wallentin I, Peltonen M (2003): Impact of blood pressure and insulin on the relationship between body fat and left ventricular structure. *European Heart Journal* 24, 1500-1505
- Kavanagh T, Mertens DJ, Hamm LF, Beyene J, Kennedy J, Corey P, Shephard RJ (2003): Peak oxygen intake and cardiac mortality in women referred for cardiac rehabilitation. *Journal of the American College of Cardiology* 42, 2139-2143
- Kavazis AN (2009): Exercise Preconditioning of the Myocardium. *Sports Med* 39, 923-935
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB (2002): Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 51, 2944-2950
- Kenchiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PWF, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS (2002): Obesity and the Risk of Heart Failure. *New England Journal of Medicine* 347, 305-313
- Koch LG, Britton SL (2001): Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. *Physiological genomics* 5, 45-52
- Koch LG, Britton SL (2005): Divergent Selection for Aerobic Capacity in Rats as a Model for Complex Disease. *Integrative and Comparative Biology* 45, 405-415
- Kokkinos P, Myers J, Kokkinos JP, Pittaras A, Narayan P, Manolis A, Karasik P, Greenberg M, Papademetriou V, Singh S (2008): Exercise Capacity and Mortality in Black and White Men. *Circulation* 117, 614-622
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JRB, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM (2008):

- Mitochondrial Overload and Incomplete Fatty Acid Oxidation Contribute to Skeletal Muscle Insulin Resistance. *Cell Metabolism* 7, 45-56
- Krum H, Gilbert RE (2003): Demographics and concomitant disorders in heart failure. *The Lancet* 362, 147-158
- Kupari M, Turto H, Lommi J (2005): Left ventricular hypertrophy in aortic valve stenosis: preventive or promotive of systolic dysfunction and heart failure? *European Heart Journal* 26, 1790-1796
- Lee DS, Pencina MJ, Benjamin EJ, Wang TJ, Levy D, O'Donnell CJ, Nam B-H, Larson MG, D'Agostino RB, Vasan RS (2006): Association of Parental Heart Failure with Risk of Heart Failure in Offspring. *New England Journal of Medicine* 355, 138-147
- Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT (2012): Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *The Lancet* 380, 219-229
- Lemieux H, Semsroth S, Antretter H, Hofer D, Gnaiger E (2011): Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. *The international journal of biochemistry & cell biology* 43, 1729-38
- Li X, Zhang P (2016): Genetic determinants of myocardial dysfunction. *Journal of Medical Genetics*
- Liew CW, Xu S, Wang X, McCann M, Whang Kong H, Carley AC, Pang J, Fantuzzi G, O'Donnell JM, Lewandowski ED (2017): Multiphasic Regulation of Systemic and Peripheral Organ Metabolic Responses to Cardiac Hypertrophy. *Circulation: Heart Failure* 10
- Liu JE, Palmieri V, Roman MJ, Bella JN, Fabsitz R, Howard BV, Welty TK, Lee ET, Devereux RB (2001): The impact of diabetes on left ventricular filling pattern in normotensive and hypertensive adults: the strong heart study. *Journal of the American College of Cardiology* 37, 1943-1949
- Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC (2010): Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiological Reviews* 90, 207-258
- Lunkenbein A, Amorim PA, Schrepper A, Schwarzer M, Mohr FW, Doenst T (2010): Pressure Overload - Induced Hypertrophy Is Linked to an Increase in Mitochondrial ROS - Production. *Clin Res Cardiol* 99, Suppl 1
- MacArdle W, Katch F, Katch V (2007): Exercise Physiology: Energy, Nutrition, & Human performance. *System* 6, 4
- Marano G, Ferrari AU (2007): Surgical Animal Model of Ventricular Hypertrophy, pp. 95-104
- Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Moe GW (2001a): Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovasc Res* 52, 103-10
- Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Moe GW (2001b): Mitochondrial pathology in cardiac failure. *Cardiovasc Res* 49, 17-26
- Marklund S, Marklund G (1974): Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry* 47, 469-474
- McMurray JJV et al. (2012): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC 33, 1787-1847

- Moe GW, Marin-Garcia J, Konig A, Goldenthal M, Lu X, Feng Q (2004): In vivo TNF- α inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 287, H1813-20
- Morris EM, Whaley-Connell AT, Thyfault JP, Britton SL, Koch LG, Wei Y, Ibdah JA, Sowers JR (2009): Low Aerobic Capacity and High-Fat Diet Contribute to Oxidative Stress and IRS-1 Degradation in the Kidney. *American Journal of Nephrology* 30, 112-119
- Murray AJ, Cole MA, Lygate CA, Carr CA, Stuckey DJ, Little SE, Neubauer S, Clarke K (2008): Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44, 694-700
- Myers J, Prakash M, Froelicher V, Do D, Partington S, Atwood JE (2002): Exercise Capacity and Mortality among Men Referred for Exercise Testing. *New England Journal of Medicine* 346, 793-801
- Nagarajan V, Kohan L, Holland E, Keeley EC, Mazimba S (2016): Obesity paradox in heart failure: a heavy matter. *Esc Heart Failure* 3, 227-234
- Nguyen TD, Shingu Y, Schwarzer M, Schrepper A, Doenst T (2013): The E-Wave Deceleration Rate E/DT Outperforms the Tissue Doppler-Derived Index E/e' in Characterizing Lung Remodeling in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *PLOS ONE* 8, e82077
- Nguyen TD, Shingu Y, Amorim PA, Schwarzer M, Doenst T (2015): Triheptanoin Alleviates Ventricular Hypertrophy and Improves Myocardial Glucose Oxidation in Rats With Pressure Overload. *Journal of cardiac failure* 21, 906-915
- Nguyen TD, Shingu Y, Amorim PA, Schenkl C, Schwarzer M, Doenst T (2018): GLP-1 Improves Diastolic Function and Survival in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Journal of Cardiovascular Translational Research*
- Nilsson BB, Westheim A, Risberg MA, Arnesen H, Seljeflot I (2010): No effect of group-based aerobic interval training on N-terminal pro- B-type natriuretic peptide levels in patients with chronic heart failure. *Scandinavian cardiovascular journal* : SCJ 44, 223-9
- Noland RC, Thyfault JP, Henes ST, Whitfield BR, Woodlief TL, Evans JR, Lust JA, Britton SL, Koch LG, Dudek RW, Dohm GL, Cortright RN, Lust RM (2007): Artificial selection for high-capacity endurance running is protective against high-fat diet-induced insulin resistance. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 293, E31-E41
- Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA (2006): Controversies in ventricular remodelling. *The Lancet* 367, 356-367
- Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, McAlister FA (2008): Body mass index and mortality in heart failure: A meta-analysis. *American Heart Journal* 156, 13-22
- Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL (1977): Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *Journal of Biological Chemistry* 252, 8731-9
- Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL (1985): Biochemical differences between subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria from rat cardiac muscle: Effects of procedural manipulations. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 236, 691-702

- Pandey A, Berry JD, Lavie CJ (2015): Cardiometabolic Disease Leading to Heart Failure: Better Fat and Fit Than Lean and Lazy. *Current Heart Failure Reports* 12, 302-308
- Paternostro G, Camici PG, Lammerstma AA, Marinho N, Baliga RR, Kooner JS, Radda GK, Ferrannini E (1996): Cardiac and skeletal muscle insulin resistance in patients with coronary heart disease. A study with positron emission tomography. *The Journal of Clinical Investigation* 98, 2094-2099
- Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD (2003): Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology* 546, 851-858
- Ponikowski P et al. (2016): 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal* 37, 2129-2200
- Powers SK, Criswell D, Lawler J, Martin D, Lieu FK, Ji LL, Herb RA (1993): Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 265, H2094-H2098
- Powers SK (2017): Exercise: Teaching myocytes new tricks. *Journal of Applied Physiology* 123, 460-472
- Prescott E, Hjarde-Hansen R, Dela F, Orkild B, Teisner AS, Nielsen H (2009): Effects of a 14-month low-cost maintenance training program in patients with chronic systolic heart failure: a randomized study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 16, 430-7
- Rimbaud S, Garnier A, Ventura-Clapier R (2009): Mitochondrial biogenesis in cardiac pathophysiology. *Pharmacological reports* : PR 61, 131-8
- Ritchie RH, Leo CH, Qin C, Stephenson EJ, Bowden MA, Buxton KD, Lessard SJ, Rivas DA, Koch LG, Britton SL, Hawley JA, Woodman OL (2012): Low intrinsic exercise capacity in rats predisposes to age-dependent cardiac remodeling independent of macrovascular function. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*
- Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE (2005): Deficiency of Subsarcolemmal Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes* 54, 8-14
- Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, Sabbah HN, Hoppel CL (2008): Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovascular Research* 80, 30-39
- Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A (1978): Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58, 1072-83
- Sandvik L, Erikssen J, Thaulow E, Erikssen G, Mundal R, Rodahl K (1993): Physical Fitness as a Predictor of Mortality among Healthy, Middle-Aged Norwegian Men. *New England Journal of Medicine* 328, 533-537
- Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, Silber RE, Holtz J (2002): Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol* 40, 2174-81
- Schrepper A, Schwarzer M, Schöpe M, Amorim PA, Doenst T (2012): Biphasic response of skeletal muscle mitochondria to chronic cardiac pressure overload

- Role of respiratory chain complex activity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52, 125-135
- Schwarzer M, Britton S, Koch L, Wisloff U, Doenst T (2010): Low intrinsic aerobic exercise capacity and systemic insulin resistance are not associated with changes in myocardial substrate oxidation or insulin sensitivity. *Basic Res Cardiol* 105, 357-364
- Schwarzer M, Schrepper A, Amorim PA, Osterholt M, Doenst T (2013): Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 304, H529-H537
- Schwarzer M, Osterholt M, Lunkenbein A, Schrepper A, Amorim P, Doenst T (2014): Mitochondrial reactive oxygen species production and respiratory complex activity in rats with pressure overload-induced heart failure. *J Physiol* 592, 3767-82
- Seifert EL, Bastianelli M, Aguer C, Moffat C, Estey C, Koch LG, Britton SL, Harper M-E (2012): Intrinsic aerobic capacity correlates with inherent mitochondrial oxidative and H₂O₂ emission capacities without major shifts in myosin heavy chain isoform. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985)
- Seljeftot I, Nilsson BB, Westheim AS, Bratseth V, Arnesen H (2011): The L-arginine-asymmetric dimethylarginine ratio is strongly related to the severity of chronic heart failure. No effects of exercise training. *Journal of cardiac failure* 17, 135-42
- Sharov VG, Goussev A, Lesch M, Goldstein S, Sabbah HN (1998): Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1757-62
- Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN (2000): Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32, 2361-7
- Sies H (2015): Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* 4, 180-183
- Srere PA, Brazil H, Gonen L (1963): The Citrate Condensing Enzyme of Pigeon Breast Muscle and Moth Flight Muscle. *Acta Chemica Scandinavica* 17, 129-134
- Stallknecht B, Vinten J, Ploug T, Galbo H (1991): Increased activities of mitochondrial enzymes in white adipose tissue in trained rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 261, E410-E414
- Stanley WC, Lopaschuk GD, McCormack JG (1997): Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovascular Research* 34, 25-33
- Stephenson EJ, Stepto NK, Koch LG, Britton SL, Hawley JA (2012): Divergent skeletal muscle respiratory capacities in rats artificially selected for high and low running ability: a role for Nor1? *Journal of Applied Physiology* 113, 1403-1412
- Stevens ALM, Ferferieva V, Bito V, Wens I, Verboven K, Deluyker D, Voet A, Vanhoof J, Dendale P, Eijnde BO (2015): Exercise improves cardiac function and attenuates insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *International Journal of Cardiology* 186, 154-160
- Störk S, Handrock R, Jacob J, Walker J, Calado F, Lahoz R, Hupfer S, Klebs S (2017): Epidemiology of heart failure in Germany: a retrospective database study. *Clinical Research in Cardiology*
- Stride N, Larsen S, Hey-Mogensen M, Sander K, Lund JT, Gustafsson F, Kober L, Dela F (2013): Decreased mitochondrial oxidative phosphorylation capacity in

- the human heart with left ventricular systolic dysfunction. *Eur J Heart Fail* 15, 150-7
- Tarnavski O (2009): Mouse Surgical Models in Cardiovascular Research. In: DiPetrillo K (Editor), *Cardiovascular Genomics: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 115-137
- Thyfaut JP, Rector RS, Uptergrove GM, Borengasser SJ, Morris EM, Wei Y, Laye MJ, Burant CF, Qi NR, Ridenhour SE, Koch LG, Britton SL, Ibdah JA (2009): Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. *The Journal of Physiology* 587, 1805-1816
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2009): Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. *Cardiovascular Research* 81, 449-456
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2011): Oxidative stress and heart failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 301, H2181-H2190
- Tweedie C, Romestaing C, Burelle Y, Safdar A, Tarnopolsky MA, Seadon S, Britton SL, Koch LG, Hepple RT (2011): Lower oxidative DNA damage despite greater ROS production in muscles from rats selectively bred for high running capacity. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 300, R544-R553
- Utriainen T, Takala T, Luotolahti M, Rönnemaa T, Laine H, Ruotsalainen U, Haaparanta M, Nuutila P, Yki-Järvinen H (1998): Insulin resistance characterizes glucose uptake in skeletal muscle but not in the heart in NIDDM. *Diabetologia* 41, 555-559
- Vakili BA, Okin PM, Devereux RB (2001): Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *American Heart Journal* 141, 334-341
- Walsh B, Hooks RB, Hornyak JE, Koch LG, Britton SL, Hogan MC (2006): Enhanced mitochondrial sensitivity to creatine in rats bred for high aerobic capacity. *Journal of Applied Physiology* 100, 1765-1769
- Warburton DER, Charlesworth S, Ivey A, Nettlefold L, Bredin SSD (2010): A systematic review of the evidence for Canada's Physical Activity Guidelines for Adults. *The International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity* 7, 39-39
- WHO (2009): Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva : World Health Organization, pp. 62
- WHO (2010): Global recommendations on physical activity for health. In: Organization WH (Hrsg.), pp. 58
- Yancy CW et al. (2013): 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: Executive Summary. A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines 128, 1810-1852
- Zaha V, Grohmann J, Göbel H, Geibel A, Beyersdorf F, Doenst T (2003): Experimental Model for Heart Failure in Rats - Induction and Diagnosis. *Thorac cardiovasc Surg* 51, 211-215
- Zeitler EP, Piccini JP, Hellkamp AS, Whellan DJ, Jackson KP, Ellis SJ, Kraus WE, Keteyian SJ, Kitzman DW, Ewald GA, Fleg JL, Pina IL, O'Connor CM (2015): Exercise training and pacing status in patients with heart failure: results from HF-ACTION. *Journal of cardiac failure* 21, 60-7

5 Anhang

5.1 Abbruchkriterien des Laufbandtests zur Ermittlung der maximalen Ausdauerkapazität

Tabelle 12 Abbruchkriterien des Laufbandtests

Kriterium	HCR	LCR
Pausieren auf der Stimulationseinheit	>3x 5 s	>6x 5 s
Laufunterbrechung auf der Stimulationseinheit	>15 s	>30 s

HCR- *High capacity runner*, LCR- *Low capacity runner*

5.2 Überlebensanalyse nach Log-Rank

Tabelle 13 Überlebensanalyse nach Log Rank. Angegeben als #-at-Risk

Zeit [Wochen]	# at Risk			
	HCR	LCR		
0,0	162	131	11,4	61
0,0	162	131	11,9	60
0,1	156	123	12,3	57
0,3	143		12,7	57
0,4	141		13,0	56
0,6	139	121	13,4	53
0,7	137	120	14,0	55
1,0	136	117	14,1	52
1,1		115	14,3	54
1,3	135	113	14,7	53
1,4		111	15,6	51
1,6		109	15,9	49
1,7		108	16,0	48
1,9		106	17,4	47
2,0	134	102	17,6	50
2,1	129	97	17,7	46
2,3	125	94	18,3	45
2,4		93	18,6	43
2,6		92	18,9	42
2,7	120		19,0	48
2,9	117		19,3	41
3,0	113	91	19,4	38
3,3	111		19,6	46
3,7	110		19,7	37
3,9	108		19,9	29
4,0	105		20,0	44
4,1	104	90	20,1	28
4,3	103		20,3	39
4,6	102		20,7	38
4,9	101	89	21,0	37
5,1	98		21,3	27
5,7	97		21,6	25
5,9	96		22,0	24
6,1		88	22,1	29
6,3	95		22,7	28
6,7	94		23,1	27
6,9	93		23,3	23
7,1	92		23,4	19
7,3		87	23,6	15
7,7	91		23,9	14
7,9	90		25,4	18
8,1	88		25,6	16
8,9	87		25,7	14
9,1	86		26,1	13
9,3	83	86	26,6	12
9,6	81	84	26,7	11
9,7	79	83	27,3	11
9,9	74	80	27,4	10
10,0	72	78	27,9	8
10,1	69	75	28,1	6
10,3		72	28,3	3
10,4	67	71	28,7	7
10,6	65	68	29,3	5
10,7	63	67	30,9	4
10,9	60		31,3	1
11,0		66	36,9	1
11,1	58	63		

5.3 Messwerte der systolischen und diastolischen Funktion

Tabelle 14 Messgrößen der systolischen und diastolischen Funktion: des linken Ventrikels im zeitlichen Verlauf der Drucküberlastung.

Parameter		Wochen TAC	HCR-C	HCR-TAC	LCR-C	LCR-TAC	Statistik		
							P	T	I
Systolische Funktion	EF [%]	2	71,5±2,1	70,6±2,3	83,7±1,5 ^{##}	87,0±2,4 ^{###}	***	ns	ns
		6	82,0±2,1	62,8±3,9 ^{***}	83,0±2,6	69,1±2,9 [*]	ns	***	ns
		10	76,4±1,7	62,2±2,7 ^{***}	81,5±1,6	74,7±3,3 ^{###}	***	***	ns
		20	73,1±1,8	62,9±2,0 ^{***}	78,2±2,0	69,2±2,2 ^{**#}	**	***	ns
	FS [%]	2	42,1±1,7	41,8±2,0 ^{***}	53,7±1,7 [#]	59,5±3,1 ^{###}	***	ns	ns
		6	53,4±2,6	36,4±2,9	53,9±2,9	41,2±2,7 ^{**}	ns	***	ns
		10	47,3±1,7	35,5±2,0 ^{***}	52,7±2,1	47,0±3,3 ^{###}	***	***	ns
		20	44,2±1,6	36,3±1,5 ^{**}	49,5±2,0	41,6±1,8 ^{**#}	**	***	ns
Diastolische Funktion	E/A	2	2,10±0,11	3,17±0,36 [*]	1,98±0,27	1,80±0,15 ^{##}	ns	ns	ns
		6	1,82±0,12	7,23±1,2 ^{**}	1,48±0,05	6,66±1,45 ^{**}	ns	***	ns
		10	2,02±0,15	10,5±2,1 ^{***}	1,93±0,22	7,40±1,96 [*]	ns	***	ns
		20	2,11±0,12	10,2±1,8 ^{***}	1,68±0,15	9,56±2,16 ^{***}	ns	***	ns
	E/e'	2	21,2±0,8	25,8±2,3 [*]	20,7±2,3	25,6±1,8	ns	*	ns
		6	21,3±2,0	30,7±1,8 [*]	16,8±0,7	32,6±2,1 ^{***}	ns	***	ns
		10	20,5±1,5	29,1±2,3 [*]	22,0±1,4	33,4±5,3 [*]	ns	**	ns
		20	17,0±0,7	29,4±2,4 ^{***}	18,7±0,9	25,5±2,5 [*]	ns	***	ns

E/A-Verhältnis aus passivem und aktivem Einstrom, E/e'-Verhältnis aus passivem Einstrom und Myokardbewegung; TAC-transversen Aortenkonstriktion. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. Werte sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*); I-Interaktion. ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

5.4 Citratsynthaseaktivität isolierter Mitochondrienpopulationen

Tabelle 15 Citratsynthaseaktivität isolierter Mitochondrienpopulationen IFM/SSM und der Homogenate von Herz-, Skelettmuskel und Leber der vier Versuchsgruppen während der Untersuchungszeitpunkte zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen

Gewebe	Population	Zeitpunkt [Wochen]	HCR Kontrolle	HCR TAC	LCR Kontrolle	LCR TAC	Statistik		
							P	T	I
Herz	Hom	2	0,93±0,22	0,85±0,20	0,76±0,03	0,97±0,12	ns	ns	ns
		10	1,06±0,25	0,96±0,1	1,23±0,19	0,56±0,11	ns	ns	ns
		20	0,55±0,1	0,59±0,08	0,49±0,07	0,75±0,21	ns	ns	ns
	IFM	2	3,71±0,69	2,90±0,40	3,36±0,67	2,99±0,31	ns	ns	ns
		10	3,68±0,25	3,85±0,43	3,56±1,07	2,45±0,49	ns	ns	ns
		20	2,26±0,21	3,11±0,25*	2,92±0,31	2,8±0,28	ns	ns	ns
	SSM	2	3,78±0,66	3,16±0,69	4,9±1,15	3,01±0,78	ns	ns	ns
		10	3,87±0,74	4,07±0,63	4,69±1,28	2,29±0,49	ns	ns	ns
		20	2,86±0,23	3,28±0,31	2,49±0,32	2,43±0,27 [#]	*	ns	ns
<i>M. gastrocnemius</i>	Hom	2	0,25±0,04	0,47±0,11	0,31±0,04	0,35±0,08	ns	ns	ns
		10	0,45±0,06	0,54±0,08	0,35±0,07	0,32±0,15	ns	ns	ns
		20	0,10±0,01	0,16±0,03	0,23±0,06 ^{##}	0,18±0,02	*	ns	ns
	IFM	2	3,03±0,49	2,05±0,39	1,94±0,27 [#]	1,62±0,29	*	ns	ns
		10	3,32±0,46	3,55±0,98	1,68±0,37	3,16±1,36	ns	ns	ns
		20	1,08±0,37	1,59±0,24	1,13±0,16	1,27±0,12	ns	ns	ns
	SSM	2	2,65±0,63	3,04±0,82	2,37±0,39	2,02±0,24	ns	ns	ns
		10	1,76±0,28	2,63±0,31	3,43±1,11	5,40±2,76	ns	ns	ns
		20	1,67±0,43	1,81±0,31	1,3±0,14	1,77±0,18	ns	ns	ns
Leber	Hom	2	0,14±0,02	0,08±0,01	0,10±0,01	0,11±0,03	ns	ns	ns
		10	0,11±0,01	0,11±0,01	0,11±0,01	0,09±0,00 [#]	ns	ns	ns
		20	0,07±0,01	0,07±0,01	0,09±0,01	0,10±0,02	ns	ns	ns
	Mito	2	0,44±0,07	0,33±0,04	0,33±0,02	0,37±0,05	ns	ns	ns
		10	0,41±0,03	0,38±0,05	0,36±0,05	0,28±0,03	ns	ns	ns
		20	0,28±0,01	0,28±0,03	0,24±0,02	0,24±0,01	ns	ns	ns

HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners, Hom-Homogenat, IFM-interfibrilläre Mitochondrien, SSM-subsarkolemmale Mitochondrien, Werte sind als Mittelwert±Standardfehler [U/mg Protein] angegeben. ns-nicht signifikant. */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

5.5 Maximale respiratorische Kapazität isolierter Mitochondrien des *M. gastrocnemius* während kardialer Drucküberlastung

interfibrilläre Mitochondrien

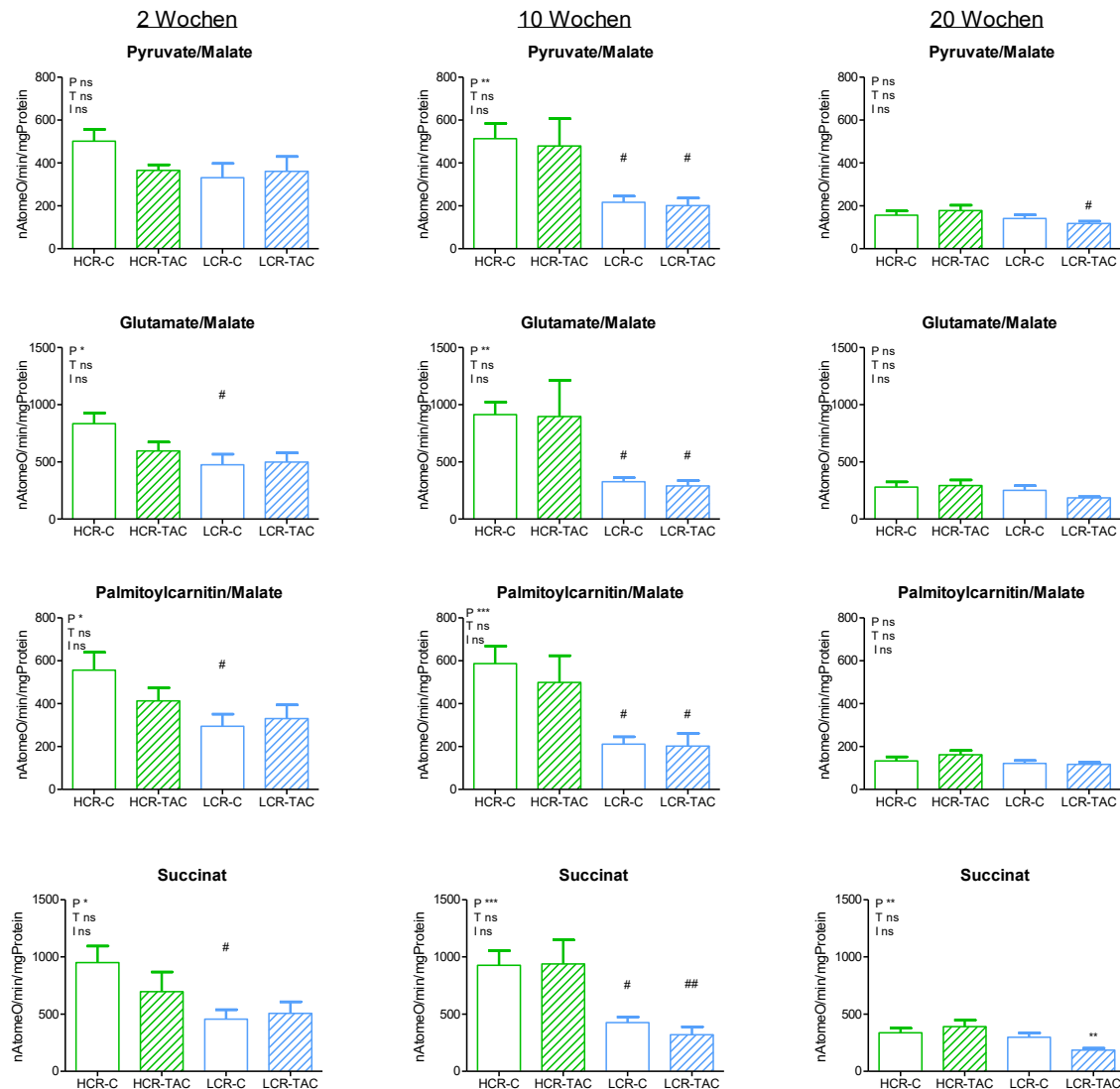


Abbildung 28 Respiratorische Kapazität interfibrillärer Mitochondrien des *M. gastrocnemius*. Maximale Respiration von SSM zu den Zeitpunkten zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=5-10.ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

subsarkolemmale Mitochondrien

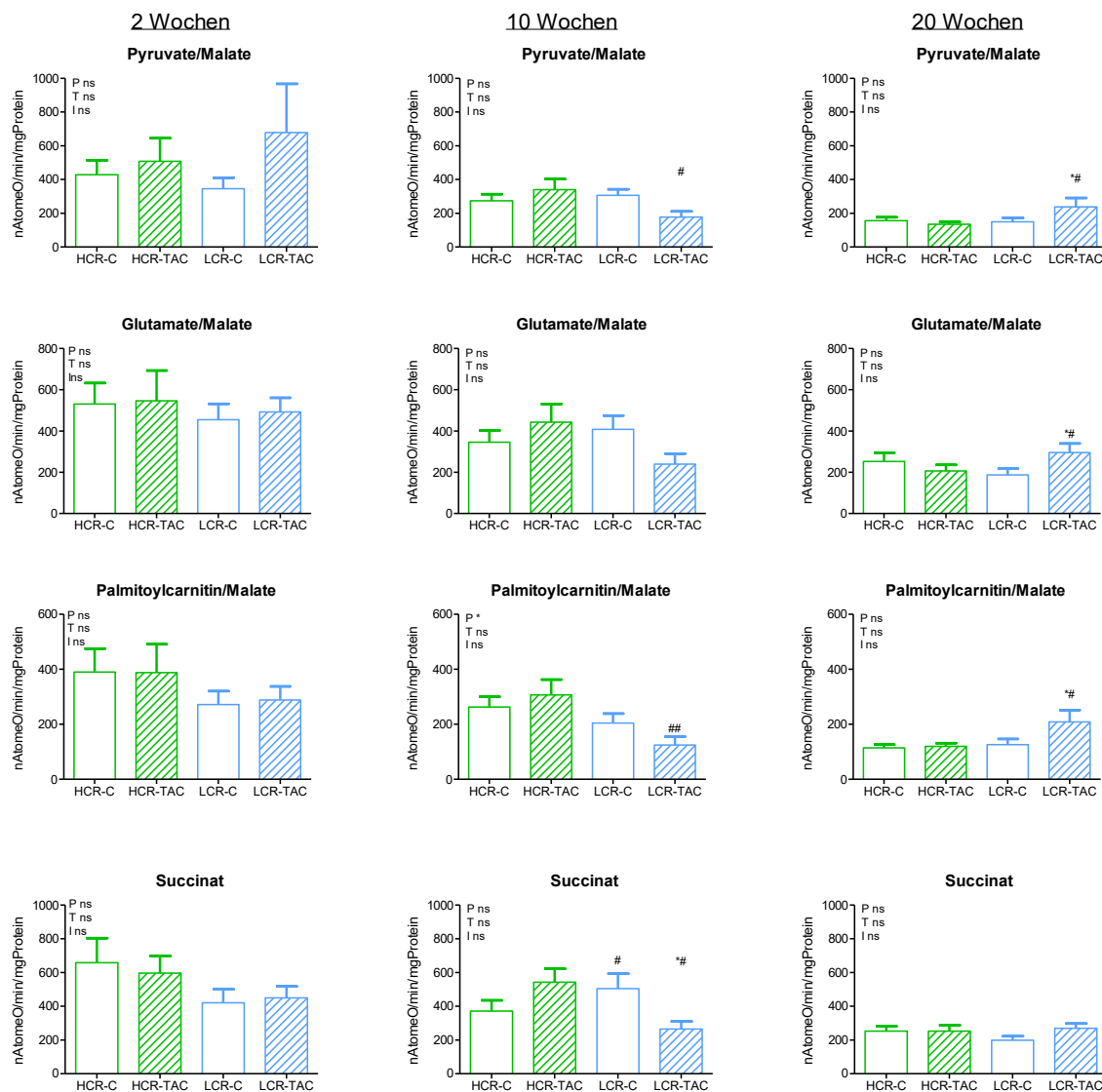


Abbildung 29 Respiratorische Kapazität subsarkolemmaler Mitochondrien des *M. gastrocnemius*. Maximale Respiration von SSM zu den Zeitpunkten zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen. HCR-High capacity runners, LCR-Low capacity runners. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. Werte sind als Mittelwert+Standardfehler angegeben. n=5-10. ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/##p < 0,01; ***/###p < 0,001

Tabelle 16 Respiratorische Kapazität der Mitochondrien des *M. gastrocnemius* unter Verwendung der Substrate PCoA/Ma, DHQ und TMPD. Maximale Respiration zwei, zehn und zwanzig Wochen nach transverser Aortenkonstriktion (TAC) und entsprechender Kontrollen

Parameter		Wochen nach TAC	HCR-C	HCR-TAC	LCR-C	LCR-TAC	Statistik		
							P	T	I
Skelettmuskel IFM	PCoA/ Ma	2	450±95	334±32	303±62	288±38	ns	ns	ns
		10	531±54	522±113	272±115 [#]	173±39 [#]	**	ns	ns
		20	531±54	522±113	272±115	173±39 [#]	*	ns	ns
	DHQ	2	1507±451	1199±291	916±138 [#]	922±192	*	ns	ns
		10	1452±193	1552±373	712±96 [#]	580±104 [#]	**	ns	ns
		20	606±71	774±112	673±70	302±48 ^{**###}	*	ns	PT**
	TMPD	2	2165±319	1593±354	1139±232 [#]	1276±276	*	ns	ns
		10	2214±324	1759±395	994±93	857±222	ns	ns	ns
		20	1066±132	1305±186	899±98	543±50 ^{###}	**	ns	PT*
Skelettmuskel SSM	PCoA/ Ma	2	370±80	442±125	349±65	346±63	ns	ns	ns
		10	289±47	293±50	236±65	152±24	ns	ns	ns
		20	148±19	190±24	123±16	123±9	ns	ns	ns
	DHQ	2	953±113	1052±238	1148±133	814±138	ns	ns	ns
		10	632±109	873±122	818±156	557±81	ns	ns	ns
		20	550±69	469±58	441±52	379±47	ns	ns	ns
	TMPD	2	1521±377	1291±236	1131±190	789±144	ns	ns	ns
		10	819±187	1097±129	1037±197	763±138	ns	ns	ns
		20	930±155	845±145	698±67	650±89	ns	ns	ns

Werte sind als Mittelwert±Standardfehler [nAtomeO/min/mg] angegeben. TAC-transverse Aortenkonstriktion, HCR-*High capacity runners*, LCR-*Low capacity runners*. P-Phänotyp (#), T-Behandlung (*), I-Interaktion. ns-nicht signifikant, */#p < 0,05; **/###p < 0,01; ***/####p < 0,001

5.6 Geräte und Instrumente

Computer mit Isoheart-Software

Druckmessgerät

Glasbestandteile der Perfusionsapparatur

Exer-3/6-Laufband Serial 06252-2 & 05118-1

Szintillationszähler LS 6500

Echokardiografiegerät Vevo 770

Wärmeplatte mit EKG Ableitern

Schallkopf RMV716

Blutzuckermessgerät FreeStyle

Blutzuckerteststreifen

Kleintierbeatmungsgerät

Mikroskop

feine Schere

abgewinkelte Pinzetten

Pinzette mit runden, kreisförmigen Köpfen

Mikropinzette mit scharfen Spitzen

Nadelhalter

Mikronadelhalter

Gefäß-Clipzange, justiert auf $\varnothing 0,35$ mm

Clips, small (Metal Ligation System)

Dispergierwerkzeug

Ultra-Turrax T25 mit S25N-18G

Ultra-Turrax T8 mit S8N-5G

Gewebehomogenisatoren nach Potter Elvehjem

Zentrifugen

Mechanische Pipetten mit Direktverdrängung

Durchflussszytometer FC-500

Clark-Elektroden

Wasserbad mit Heizspindel

Photometer

Millar Instruments

P.A. Brooks – Prototype

Scientific Glass Blower

Columbus Instruments

Beckmann Coulter

Fujifilm VisualSonics®s

Fujifilm VisualSonics®

Abbott GmbH & Co. KG,

Abbott GmbH & Co. KG

Columbus Instruments

Zeiss

Weck® Horizon™

Weck® Horizon™

IKA®-Werke

IKA®-Werke

VWR Collection

eppendorf

Gilson

Beckman Coulter

Strathkelvin

Biotek

5.7 Verbrauchsmaterialien

Leukoflex

4-0 Vicryl-Plus

5-0 Prolene

Ligatur ClipsClips, small (Metal Ligation System)

Sterile Wattestäbchen

Spritzen und Kanülen, versch.

peripherer Venenverweilkatheter (18G/1,2 mm)

Zentrifugenröhrchen

BSN Medical

Ethicon (VCP315H)

Ethicon (8710H)

Weck® Horizon™

NOBAMED Paul Danz AG

B. Braun Melsungen AG

B. Braun Melsungen AG

ThermoFischer

96-Kavitäten-Microtiterplatten
Reaktionsgefäße, versch.

Greiner BioOne
Greiner BioOne

5.8 Chemikalien

[9,10-³H] Oleat

[U-¹⁴C] Glukose

30% Polyacrylamid

Adenosindiphosphat

Adenosintriphosphat

Ammoniumperoxisulfat (APS)

Antikörper:

Anti-Akt (#92726)

Anti-IRβ (#3025)

Anti-p- Rβ (#3024S)

Anti-p-Akt (#9271S)

Anti-GLUT-4 (#07-1404)

Anti-GAPDH (#ab7269)

Anti-rabbit ECL IgG (#NA934V)

Benzethonium hydroxide

Biozym SE

Bovines Serumalbumin (BSA)

Bromphenolblau

Calciumchloriddihydrat

Chemiluminescence reagent for horseradish
peroxidase

Coomassieblau

Cumene Hydroperoxide

Di-Kaliumhydrogenphosphat

Dinitrophenol

Dithiothreitol DTT

EDTA

EGTA

Essigsäure

Färbereagenz-Konzentrat

Glukose

Glycerol

Glycin

Hepes

Isopropanol (2-Propanol)

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogenphosphat

Kaliumchlorid

Kaliumhydrogenphosphat

PerkinElmer

PerkinElmer

AppliChem

Sigma-Aldrich®

Sigma-Aldrich®

Carl Roth®

Cell Siganlling

Cell Siganlling

Cell Siganlling

Cell Siganlling

Millipore

AbChem

GE Healthcare

Sigma-Aldrich®

Claude Cosmetics

Sigma-Aldrich®

Carl Roth®

Merck Chemicals GmbH

SERVA

SERVA

Sigma-Aldrich®

Sigma-Aldrich®

Sigma-Aldrich®

Carl Roth®

Carl Roth®

Carl Roth®

Carl Roth®

Biorad

Sigma-Aldrich®

Sigma-Aldrich®

Carl Roth®

Sigma-Aldrich®

Sigma-Aldrich®

Merck Chemicals GmbH

Riedel-de Haën AG

Carl Roth®

Carl Roth®

Katalase (Aspergillus niger)	Carl Roth®
Kumarinsäure	Sigma-Aldrich®
L-Carnitin	Sigma-Aldrich®
Luminol	Fluka
Magermilchpulver	Carl Roth®
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich®
Magnesiumsulfatheptahydrat	Merck Chemicals GmbH
Malat	Sigma-Aldrich®
Mannitol	Sigma-Aldrich®
Masson's Trichrom Färbung	Sigma-Aldrich®
Methanol	Carl Roth®
MOPS	Sigma-Aldrich®
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	Sigma-Aldrich®
Natriumchlorid	Carl Roth®
Natriumchlorid, Lsg., 0,9%	Fresenius Kabi
Natriumdiphosphat	Sigma-Aldrich®
Nafluorid	Sigma-Aldrich®
Natriumglutamat	Sigma-Aldrich®
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën AG
Natriumhydroxid	Carl Roth®
Naphtol Blue Black	Fluka, 70492
Natriumoleat	Sigma-Aldrich®
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich®
Oleat	Sigma-Aldrich®
Palmitolycarnitin	Sigma-Aldrich®
Palmitoyl-CoA	Sigma-Aldrich®
PMSF	Carl Roth®
Precision Protein Streptactin-HRP Conjugate	Bio-Rad
Protease Inhibitor Cocktail-Tabletten	Sigma-Aldrich®
Proteaseinhibitor-Tabletten (Complete mini)	Sigma-Aldrich®
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
Protein Standard flüssig, 2 mg protein/ml	Sigma-Aldrich®
Proteinstandard	Sigma-Aldrich®
Pyrogallol	Sigma-Aldrich®
Resin chloride Form	Bio-Rad Laboratories
Salzsäure	Carl Roth®
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth®
Succinat	Sigma-Aldrich®
Succrose	Sigma-Aldrich®
TEMED	Sigma-Aldrich®
Tetramethylhydroquinone	Sigma-Aldrich®
Trichrom Färbereagenz	Sigma-Aldrich®
Tris (basisch)	Carl Roth®

Tris-HCl	Sigma-Aldrich®
Triton -X 100	Sigma-Aldrich®
Trypsin	Sigma-Aldrich®
Tween 20	AppliChem
Ultima Gold	PerkinElmer
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich®

5.9 Medikamente

Insulin	
Isofluran	Piramal Critical Care
Ketamin	Inresa Arzneimittel GmbH
Medetomidin (Domitor®)	Orion Pharma
Metamizol (Novaminsulfon)	Zentiva Pharma
Novaminsulfon-ratiopharm®	Ratiopharm
Xylazin (ROMPUN®)	Bayer
Thiopenthal	Inresa Arzneimittel GmbH

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der Stadien der Herzinsuffizienz.....	15
Abbildung 2 Schematische Darstellung von kardialer und mitochondrialer Funktion und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im zeitlichen Verlauf nach transverser Aortenkonstriktion	15
Abbildung 3 Prognostizierte Herzinsuffizienzentwicklung bei HCR und LCR Ratten	17
Abbildung 4 Studiendesign	18
Abbildung 5 Echokardiografische Darstellung des linken Ventrikels	22
Abbildung 6 Diastolische Funktion: PW-Modus und Gewebedoppler	22
Abbildung 7 Schematische Darstellung der Zentrifugationsschritte zur getrennten Isolation von interfibrillären und subsarcolemmalen Mitochondrien.....	25
Abbildung 8 Mitochondriale Atmungskette und Transporter der Substrate.....	28
Abbildung 9 Schematische Darstellung einer Messung der respiratorischen Kapazität isolierter Mitochondrien.....	29
Abbildung 10 Überleben von HCR und LCR während kardialer Drucküberlastung ..	34
Abbildung 11 Diastolische Funktion: Verhältnisse aus passivem und aktivem Einstrom (E/A) und passivem Einstrom und Myokardbewegung (E/e')	37
Abbildung 12 Systolische Funktion: Auswurf- und Verkürzungsfraction des linken Ventrikels.....	38
Abbildung 13 Entwicklung von Körper-, Herz- und Lungengewichten	39
Abbildung 14 Messgrößen der Glukosetoleranz.....	41
Abbildung 15 Kardiale Insulinempfindlichkeit.....	43
Abbildung 16 Größe und Komplexität der Mitochondrien	44
Abbildung 17 Citratsynthaseaktivität der Gewebehomogenate	46
Abbildung 18 Respiratorische Kapazität interfibrillärer Mitochondrien des <i>M. gastrocnemius</i> von Kontrolltieren	47
Abbildung 19 Respiratorische Kapazität subsarkolemmaler Mitochondrien des <i>M. gastrocnemius</i> von Kontrolltieren	48
Abbildung 20 Respiratorische Kapazität kardialer infibrillärer Mitochondrien	50
Abbildung 21 Respiratorische Kapazität kardialer subsarkolemmaler Mitochondrien	51
Abbildung 22 Respiratorische Kapazität mit den Substraten PC und PCoA.....	56
Abbildung 23 CPT-Gesamtaktivität des Herzmuskelgewebes.....	57
Abbildung 24 Aktivität kardialer antioxidativer Enzyme	58

Abbildung 25 Isoliert arbeitende Herzen nach zehn Wochen transverser Aortenkonstriktion	60
Abbildung 26 Strukturelle Veränderung des Myokards des linken Ventrikels	61
Abbildung 27 Strukturelle Veränderung des Lungengewebes	61
Abbildung 28 Respiratorische Kapazität interfibrillärer Mitochondrien des <i>M. gastrocnemius</i>	V
Abbildung 29 Respiratorische Kapazität subsarkolemmaler Mitochondrien des <i>M. gastrocnemius</i>	VI

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zeitpunkte einzelner Untersuchungen	19
Tabelle 2 Parameter des linken Ventrikels mit Messmethode und Berechnung	21
Tabelle 3 Zusammensetzung des Elektrophoresegels	24
Tabelle 4 Morphometrie des linken Ventrikels	35
Tabelle 5 Funktionelle Messwerte des linken Ventrikels.....	37
Tabelle 6 Alter, Tibialänge und Organgewichte	40
Tabelle 7 Proteinmengen isolierter Mitochondrienpopulationen IFM/SSM und des Homogenats	45
Tabelle 8 Respiratorische Kapazität kardialer Mitochondrien	52
Tabelle 9 Maximale Respiration der Lebermitochondrien.....	53
Tabelle 10 Phosphorylierungseffizienz kardialer Mitochondrien	55
Tabelle 11 Isoliert arbeitende Herzen nach zwei Wochen transverser Aortenkonstriktion	59
Tabelle 12 Abbruchkriterien des Laufbandtests.....	I
Tabelle 13 Überlebensanalyse nach Log Rank	II
Tabelle 14 Messgrößen der systolischen und diastolischen Funktion	III
Tabelle 15 Citratsynthaseaktivität isolierter Mitochondrienpopulationen IFM/SSM und der Homogenate	IV
Tabelle 16 Respiratorische Kapazität der Mitochondrien des <i>M. gastrocnemius</i> unter Verwendung der Substrate PCoA/Ma, DHQ und TMPD.....	VII

Danksagung

Besonderer Dank gebührt Dr. Michael Schwarzer für die zahlreichen offenen Gespräche auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene, für die Freiheit, die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährte, und sein Vertrauen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Torsten Doerst, weil er mir zutraute dieses sportliche Projekt zu übernehmen und für seine bedeutende Unterstützung über die Zeit der Promotion hinaus.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Wetzker danke ich für seine hilfsbereite und wissenschaftliche Unterstützung als Zweitbetreuer.

Großer Dank gilt jedem einzelnen meiner Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Herz- und Thoraxchirurgie des UKJ für ihren ganz individuellen Beitrag wissenschaftlicher, kritischer, herzlicher und ermutigender Art, der zum Entstehen meiner Arbeit beigetragen hat.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für Aufwind und Flügelstutzen zur rechten Zeit.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben Prof. Torsten Doenst, und Dr. Michael Schwarzer.

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 23.03.2018

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers